

**UNIVERSITE DE SHERBROOKE**

**IDENTIFICATION DES MUTATIONS DANS LE GENE NF1  
RESPONSABLE DE LA MALADIE DE VON RECKLINGHAUSEN  
CHEZ LES PATIENTS DE LA CLINIQUE DE NEUROFIBROMATOSE  
DU CENTRE UNIVERSITAIRE DE SANTE DE L'ESTRIE (CUSE)**

**par**

**RAKOTOSON Dieudonné Jocelyn**

**Département de microbiologie**

**Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophae Doctor (Ph.D.)**

**Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin 1998**



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40531-1

Canada

***«Prenez garde que personne ne rende le mal pour le mal, mais cherchez en tout temps à pratiquer le bien entre vous et envers tous les hommes. Soyez toujours joyeux, priez sans cesse, remerciez Dieu en toute circonstance. Voilà ce que Dieu demande de vous, dans votre vie avec Jésus Christ. Ne faites pas obstacle à l'action du Saint-Esprit; ne méprisez pas les messages inspirés. Mais examinez toutes choses: retenez ce qui est bon, et abstenez-vous de toute espèce de mal.»***

**1 Thessaloniens 5: 15-22**

***«Au fur et à mesure de l'application des techniques de biologie cellulaire et moléculaire à la recherche médicale, la plupart des énigmes de la pathologie humaine seront résolues dans les toutes prochaines années... Je suis convaincu que les Sciences Médicales vont désormais connaître la phase la plus productive et la plus passionnante de leur histoire.***

***Heureux les jeunes praticiens qui vont en être les acteurs! »***

**Sir David J. Weatherall**

**(The New Genetics and Clinical Practice, 1985)**

## **TABLE DES MATIÈRES**

	<b><u>Pages</u></b>
Table des matières .....	i
Liste des figures .....	iii
Listes des tableaux .....	v
Liste des abréviations .....	vi
Résumé .....	ix

### **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

I-La neurofibromatose .....	1
II-La clinique de neurofibromatose de l'Estrie .....	5
III-Le gène de la neurofibromatose de type 1 .....	6
IV-But et stratégie de l'étude .....	14

### **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

I-La clinique de neurofibromatose de l'Estrie .....	16
II-Étude des haplotypes .....	17
II-1-Collecte des échantillons sanguins .....	17
II-2-Préparation des leucocytes et extraction de l'ADN génomique.....	14
II-3-Le polymorphisme de longueur de fragments de restriction .....	19
II-4-Les microsatellites .....	21
III- Détection des mutations du gène NF1 .....	24
III-1-La préparation des lignées lymphoblastoïdes .....	24
III-2-L'extraction des ARNs des lignées lymphoblastoïdes .....	25
III-3-La rétrotranscription (RT) .....	26
III-4-Les PCRs de l'ADNc du gène NF1 .....	26
III-5-Le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin .....	29
III-6-Le séquençage .....	31



### **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

I- Caractéristique de la clinique de neurofibromatose de l'Estrie .....	32
II- Le diagnostic moléculaire indirect .....	33
II-1-Étude des haplotypes .....	33
II-2-Analyse de l'informativité des marqueurs génétiques .....	59
III-Le diagnostic moléculaire direct : Recherche des mutations .....	62
III-1-Recherche de mutations par migration électrophorétique .....	64
III-2-Le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin .....	67
III-3-L'amplification par PCR suivie d'un séquençage .....	69

### **CHAPITRE IV : DISCUSSIONS ET COMMENTAIRES**

I-La clinique de la neurofibromatose .....	72
II-Le diagnostic moléculaire indirect .....	73
III-La détection des mutations .....	77

### **CHAPITRE V : CONCLUSIONS** .....

Remerciements .....	87
---------------------	----

Bibliographie .....	88
---------------------	----

#### **Annexe :**

Annexe I : L'ADNc du gène NF1 .....	97
Annexe II : La neurofibromine .....	105

## **LISTE DES FIGURES**

### **Pages**

Figure 1 :	Cartographie du chromosome 17 dans la région du gène NF1 .....	8
Figure 2 :	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction .....	20
Figure 3 :	Les microsatellites .....	22
Figure 4 :	Amplification par PCR de l'ADNc du gène NF1 .....	27
Figure 5 :	Mise en évidence d'une mutation par SSCP .....	30
Figure 6 :	Haplotype de la famille "A" .....	36
Figure 7 :	Haplotype de la famille "B" .....	37
Figure 8 :	Haplotype de la famille "C" .....	39
Figure 9 :	Haplotype de la famille "D" .....	40
Figure 10 :	Haplotype de la famille "E" .....	42
Figure 11 :	Haplotype de la famille "F" .....	43
Figure 12 :	Haplotype de la famille "G" .....	45
Figure 13 :	Haplotype de la famille "H" .....	46
Figure 14 :	Haplotype de la famille "I" .....	48
Figure 15 :	Haplotype de la famille "J" .....	49
Figure 16 :	Haplotype de la famille "K" .....	51
Figure 17 :	Haplotype de la famille "L" .....	52
Figure 18 :	Haplotype de la famille "M" .....	54

Figure 19 :	Haplotype de la famille "N" .....	55
Figure 20 :	Haplotype de la famille "O" .....	57
Figure 21 :	Haplotype de la famille "P" .....	58
Figure 22 :	Qualité des ARNs extraits .....	63
Figure 23 :	Amplification par PCR de l'ADNc du gène NF1 .....	65
Figure 24 :	La délétion de 13 pb dans l'exon 28 .....	66
Figure 25 :	La délétion T 6538 détectée par SSCP .....	68
Figure 26 :	La mutation P1421L identifiée par le séquençage direct .....	70

**LISTE DES TABLEAUX****Pages**

Tableau 1 :	Critère de diagnostic de NF1 .....	4
Tableau 2 :	Les microsatellites au niveau du gène NF1 .....	22
Tableau 3 :	Amplification par PCR de l'ADNc du gène NF1 .....	27
Tableau 4 :	Taux d'hétérozygotie des marqueurs génétiques .....	60
Tableau 5 :	Relation entre maladie et le site de restriction .....	60
Tableau 6 :	Relation entre maladie et la longueur des microsatellites .....	61
Tableau 7 :	Mutations caractérisées chez les patients NF1 sporadiques .....	71

## LISTE DES ABREVIATIONS

A	:	Adénosine
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
BSA	:	Albumine sérique de boeuf
cM	:	Centimorgan
C	:	Cytidine
°C	:	Dégré Celsius
cpm	:	Coup par minute
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
dATP	:	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	:	Désoxycytidine triphosphate
ddNTP	:	Didésoxyribonucléotides triphosphates
DEPC	:	Diéthylpyrocarbonate
dGTP	:	Désoxyguanosine triphosphate
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
dNTP	:	Désoxyribonucléotides triphosphates
dTTP	:	Désoxythymidine triphosphate
D.O.	:	Densité optique
DTT	:	Dithiothréitol

E	:	Exon
EDTA	:	Ethylène diamine tétraacétate
g	:	Unité de force centrifuge
G	:	Guanosine
HCl	:	Acide chlorhydrique
I	:	Intron
Iscoe	:	Milieu Dulbecco Modifié
kb	:	Kilo paire de base
kDa	:	Kilo dalton
μCi	:	MicroCurie
μg	:	Microgramme
μl	:	Microlitre
μM	:	Micromolaire
mg	:	Milligramme
mM	:	Millimolaire
min	:	Minute
ml	:	Millilitre
M	:	Molaire
MgCl <sub>2</sub>		Chlorure de magnésium
NaCl	:	Chlorure de sodium
NaOH	:	Hydroxyde de sodium
NE	:	Tampon NaCl 105 mM, 26.38 mM EDTA pH 8

nts	:	Nucléotides
pb	:	Paire de base
PCR	:	Polymerase chain reaction
p/v	:	Poids sur volume
qsp	:	Quantité suffisante
rpm	:	Révolution par minute
sec	:	Seconde
SDS	:	Sulfate dodecyl de sodium
SSCP	:	Single strand conformational polymorphism
T	:	Thymine
TE	:	Tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5
Tris	:	Hydroxyméthylaminométhane
U	:	Unité enzymatique
UV	:	Rayon Ultra-Violet
v/v	:	Volume sur volume

## **RÉSUMÉ**

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une des maladies héréditaires les plus fréquentes. La maladie de Von Recklinghausen représente une entité cliniquement hétérogène caractérisée par la présence de taches café au lait qui sont constantes et plus précoces et les neurofibromes qui sont des tumeurs bénignes et qui apparaissent tardivement. La NF1 se transmet selon un mode autosomique dominant, avec expressivité variable. Elle touche toutes les races avec une incidence de 1 pour 3500 naissances (Riccardi, 1992). 50% des cas sont d'origine familiale et 50% sont sporadiques. La fréquence des mutations nouvelles est très élevée, ce qui pose un problème dans le diagnostic clinique. En effet, le diagnostic moléculaire grâce à l'étude de linkage des haplotypes avec des marqueurs de polymorphismes de l'ADN est utile pour les cas familiaux. Par contre, pour les cas sporadiques, l'identification des mutations liées à la maladie est la seule solution.

Au cours de ce travail, nous avons analysé la symptomatologie clinique des patients atteints de la neurofibromatose de type 1 de la clinique NF de l'Estrée en servant les bases de données stockées dans le programme "NF Baylor Database". Grâce à ces informations, nous avons une idée de la caractéristique des manifestations pathologiques de cette maladie dans la région de l'Estrée pour améliorer la prise en charge, le conseil et le traitement des patients.

Ensuite, nous avons analysé les haplotypes de seize familles atteintes de neurofibromatose de type 1 de la clinique NF de l'Estrée en utilisant des marqueurs très informatifs de types microsatellites et un marqueur RFLP. Ces marqueurs nous permis d'identifier l'allèle muté et par conséquent un diagnostic présymptomatique ou prénatal de la maladie est possible. Grâce à ces



marqueurs, il a été possible d'identifier deux délétions dues à une perte d'hétérozygotie chez deux familles. La première délétion commence au moins à l'exon 5 jusqu'à l'intron 38 au sein de la famille "H" et la deuxième délétion débute à l'exon 5 jusqu'à l'intron 26 que nous avons diagnostiqué chez la famille "L".

Enfin, chez huit individus NF1 sporadiques c'est à dire sans histoire familiale de la maladie évidente, nous avons développé une stratégie de recherche des mutations du gène codant la neurofibromine en analysant les produits d'amplification de tout l'ADNc par RT-PCR afin d'éviter d'analyser l'ADN génomique qui est de grande taille et dans le but d'identifier les mutations de délétions, d'insertions ou ponctuelles. Par une migration électrophorétique sur gel d'acrylamide 5%, nous avons remarqué une bande supplémentaire qui migre plus vite que la bande normale amplifiée par le couple K7K8 chez le patient n°2 (Rou 262), nous avons séquencé séparément les deux bandes et nous avons détecté une délétion de 13 pb dans l'exon 28. Par la méthode de polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin ou SSCP, nous avons remarqué la présence de migration type hétéroduplexe avec le couple K17K18 chez le patient n°5 (Rou 5002), nous avons séquencé le fragment, nous avons identifié une délétion du T en position 6538 dans l'exon 34 et qui entraîne une modification du cadre de lecture de l'ARNm (frameshift mutation) et arrêt de la traduction. Enfin, le séquençage direct sans passer l'étape de clonage moléculaire des produits RT-PCR dans la région GRD (GTPase Related Domain) permet d'identifier une mutation 4199 C en T dans l'exon 24 chez le patient n°8 (Rou 5882) qui entraîne la transformation de la proline 1421 (CCG) en leucine (CTG).

## **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

### **I-La neurofibromatose**

La neurofibromatose a été décrite la première fois en 1793 par Tisellius (Riccardi, 1992), puis mieux documentée en 1882 par Von Recklinghausen, d'où son appellation de maladie de Von Recklinghausen. Elle fait partie des phacomatoses, en référence aux taches cutanées. Elle est la neuroectodermose la plus fréquente. Selon le consensus de la conférence du NIH (National Institute of Health) et la fondation NNF (National Neurofibromatosis Foundation), on en distingue deux types principaux (1 et 2) qui comportent tous deux des manifestations neurologiques périphériques et centrales ; c'est pourquoi les appellations neurofibromatose périphérique (type 1) et neurofibromatose centrale (type 2) sont écartées, car prêtant à confusion (Riccardi, 1992).

La neurofibromatose de type 1 est la variété de très loin la plus fréquente, dont l'incidence est d'environ 1 pour 3500. Son gène est porté par la région péricentromérique du bras long du chromosome 17 (Barker et al., 1987 ; Seizinger et al., 1989). Sa transmission est autosomique dominante, avec expressivité variable. Au moins la moitié des cas sont dus à une mutation sporadique. Il n'y a pas de prédominance raciale, ni géographique ; les deux sexes sont touchés avec une fréquence et sévérité égales (Riccardi, 1992).

La neurofibromatose de type 2 est beaucoup plus rare que la précédente : son incidence est estimée à 1 pour 100.000. Son gène est porté par le bras long du chromosome 22. La transmission est autosomique dominante avec pénétrance complète. D'autres types de neurofibromatose ont été proposés par Riccardi dans le but didactique et de recherche (Riccardi, 1992). Le présent travail concerne uniquement la neurofibromatose de type 1.

La première lésion cutanée est la tache café au lait, elle est plus importante avant l'âge de 5 ans ; On y note une surcharge mélanique de la couche basale avec des mélanosomes anormalement volumineux ; le nombre des mélanocytes dopa + par  $\text{cm}^2$  est augmenté par rapport à celui de la peau normale avoisinante (Riccardi, 1992). Les taches lenticulaires ou lentigines sont dues à la présence de très nombreux mélanocytes et d'amas de pigments sur les bourgeons interpapillaires, qui sont allongés et élargis (Riccardi, 1992).

Le neurofibrome donne son nom à la maladie. Il est constitué essentiellement par des éléments schwanniens allongés et sinueux groupés en faisceaux disséminés dans une trame conjonctive faite de fibre collagène jeune ou sclérosée (d'où le nom de neurofibrome). Dans les interstices de la trame conjonctive, on trouve constamment des cellules endoneurales à petit noyau et assez souvent des mélanoblastes. L'ensemble peut entourer des filets nerveux myéliniques ou amyéliniques. Il s'agit d'une tumeur généralement bien limitée ; il peut réaliser un neurone plexiforme, intéressant de nombreux filets nerveux (Riccardi, 1992).

Les nodules de Lisch sont des hamartomes iriens pigmentés asymptomatiques, rarement décelés à l'oeil nu ou seulement par examen à la lampe à fente. Ils s'observent chez 28% des malades âgés de moins de 6 ans. Ils sont le fait des neurofibromatoses de type 1, où leur présence est de valeur diagnostique car ces nodules ne se rencontrent pas chez le sujet normal, mais ils ne sont pas corrélés aux manifestations de la maladie ni à son degré de sévérité (Riccardi, 1992).

La pathogénie de la neurofibromatose de type 1 est encore obscure. Les composantes cellulaires trouvées dans les lésions caractéristiques de la maladie dérivent pour la plupart des cellules de la crête neurale ; la maladie serait une "neurocristopathie", lors de laquelle existerait un trouble de la migration et de la différenciation des cellules issues de la crête neurale et principalement des neuroblastes à l'origine des cellules de Schwann et de l'épinèvre (Riccardi, 1992).

Selon le consensus de conférence au NIH, le diagnostic peut être posé, quand 2 au moins des atteintes suivantes sont présentes : Au moins 6 taches café au lait dont le plus grand diamètre est supérieur à 5 mm avant la puberté, à 15 mm après la puberté ; au moins 2 neurofibromes de type quelconque, ou 1 névrome plexiforme ; ou taches lenticulaires axillaires ou inguinales ; ou gliome optique ; ou au moins 2 nodules de Lisch ; ou ascendant direct, membre de la fratrie ou enfant présentant une neurofibromatose de type 1 reconnue (Riccardi, 1992) (Tableau 1).

L'évolution de la maladie est très lente. Les manifestations dermatologiques sont en règle les premières en date, apparues le plus souvent dès la première année de la vie. D'autres atteintes sont susceptibles d'apparaître, en particulier à la puberté et durant l'adolescence, les plus importantes survenant le plus souvent durant les 20 premières années de la vie (Riccardi, 1992). Des stades de gravité croissante ont été établis ; les stades I et II (les moins sévères) concernent environ 75% des malades. Cependant, le stade auquel se trouve le malade et le nombre d'années depuis lesquelles il est à ce stade ne permettent pas de prédire l'évolution finale (Riccardi, 1992).

CRITÈRE DE DIAGNOSTIC CLINIQUE DE NF1
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Au moins 5 taches café au lait :            &gt;à 1.5 cm après la puberté            &gt;à 0.5 cm avant la puberté</li> <li>2. Au moins deux neurofibrome, quel que soit le type</li> <li>3. Au moins un neurofibrome plexiforme</li> <li>4. Gliome du nerf optique</li> <li>5. Au moins deux nodules de Lisch</li> <li>6. Lésions osseuses</li> <li>7. Un apparenté de premier degré atteint de NF1</li> </ol>
<p>Pour faire le diagnostic de la neurofibromatose de type 1,          au moins deux de ces signes doivent être réunis          chez un même individu.</p>

**Tableau 1**: Critère de diagnostic de NF1.

(Selon le consensus de la conférence NIH)

En définitive, deux ordres de faits sont à considérer, impliquant la nécessité de suivre régulièrement les malades. D'une part, le pronostic vital, mis en jeu par certaines localisations, en particulier neurologique et par la survenue de lésions malignes : 20% des cas chez l'adulte. D'autre part, le pronostic fonctionnel, qui dépend du siège des lésions, de leur type, et des possibilités thérapeutiques. Le traitement est fonction des lésions et de leur complication (Riccardi, 1992).

Le conseil génétique de la neurofibromatose demeure une entreprise difficile pour plusieurs raisons. Premièrement, en dépit du clonage du gène NF1, trouver la mutation responsable est une tâche coûteuse, laborieuse, qui peut rendre inconcevable le diagnostic anténatal d'un sujet atteint isolément dans une famille malgré son risque de 50% et ceci d'autant plus qu'il peut être difficile en présence d'une anomalie ponctuelle de l'ADN de faire la part entre une véritable mutation et un polymorphisme. Deuxièmement, en raison du taux élevé de néo-mutation, le risque génétique des apparentés d'un cas isolé reste entièrement dépendant d'un examen clinique rigoureux (Riccardi, 1992 ; Upadhyaya et al., 1995).

## **II- La clinique de neurofibromatose de l'Estrée**

Une équipe multidisciplinaire a été formée pour mener à bien l'établissement de la clinique de NF de l'Estrée ; elle est formée de neuropédiatre, neurologue , dermatologue, ophtalmologiste, une coordonnatrice et d'autres consultants selon les besoins. Les informations pertinentes aux dossiers sont recueillies pour être ensuite classifiées dans une banque de donnée informatique à l'aide du programme "Baylor NF Program Database". Les individus ayant une atteinte subjective de la neurofibromatose au dossier ont reçu de l'information concernant l'existence de la clinique

et son rôle. Ils sont ensuite invités à venir à la clinique pour évaluation de leur condition de santé et celle de leur famille immédiate.

La clinique de neurofibromatose de l'Estrie a pour but d'établir un registre qui servira à planifier, organiser et maintenir une clinique de NF pour la région de l'Estrie ; déterminer l'incidence des manifestations variables de la NF selon la classification des types suggérés par Dr Riccardi, par une étude clinique et paraclinique des familles recensées au cours des dernières années ; utiliser les outils de la biologie moléculaire pour offrir un diagnostic préclinique, clinique et prénatal, dans le but ultime d'améliorer la classification, les soins aux patients, le conseil génétique et surtout la recherche tant clinique que fondamentale ( Carmant et al., 1990 ; Guité et Lemieux, 1992).

Étant donné le peu de données recueillies jusqu'à présent, nous ne pouvons pas interpréter les résultats ni même estimer une prévalence de la maladie dans la population. On espère avoir amassé assez de données pour analyser les résultats avec une valeur statistique intéressante. Pour le moment, on se contente de présenter l'importance de signes présentés par les patients à la clinique de NF de l'Estrie.

### **III- Le gène de la neurofibromatose de type 1**

Le consortium international d'analyse génétique de NF1 (International NF1 Genetic Analysis Consortium) collabore à la recherche sur la neurofibromatose. L'identification du gène NF1 a été effectuée par clonage positionnel puisque la nature exacte de la protéine était totalement inconnue. Le gène NF1 a d'abord été localisé par cartographie d'exclusion, méthode qui

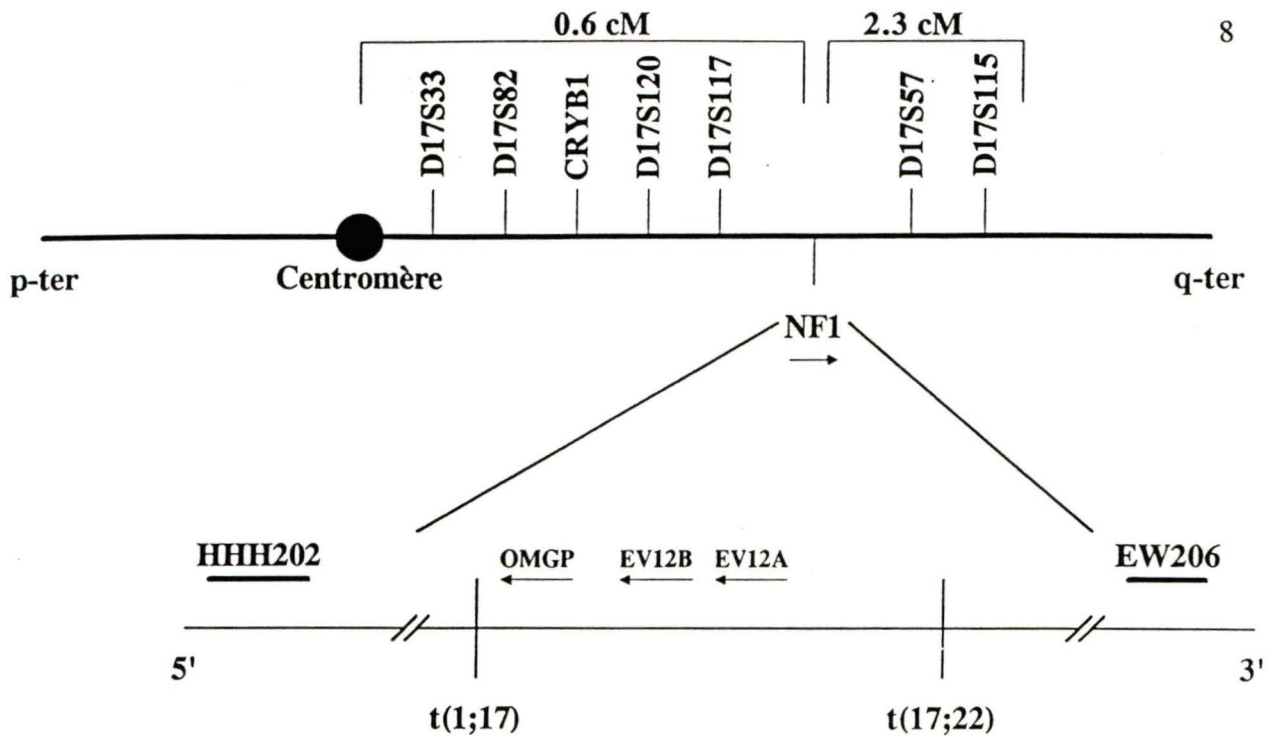
consiste à analyser la ségrégation de la maladie avec des polymorphismes de l'ADN (Fountain et al., 1989 ; Cawthon et al., 1990b).

Ainsi, en 1987, en utilisant un large répertoire de sondes, il a été possible de localiser le locus NF1 dans la région péricentromérique du chromosome 17. La mise en évidence de translocations équilibrées chez deux patients atteints de NF1 t (1; 17) (p 34.3; q 11.2) et t (18; 22) (q 11.2; q 11.2) a ensuite permis non seulement de confirmer la localisation fine du gène en 17 q 11.2, mais a aussi également servi de points de repère pour l'identification du gène puisque les deux points de cassure n'étaient distants que de 60 kb (Barker et al., 1987; Ledbetter et al., 1989; O'Connell et al., 1989 ; Cawthon et al., 1990b).

En juillet 1990, les groupes de F. Collins et L. White ont simultanément isolé et cartographié l'ADNc du gène NF1. Le gène NF1 s'étend sur plus de 350 kb. Il contient 57 exons et présente la particularité de contenir à l'intérieur de l'intron 27 trois gènes transcrits en direction opposée : EV12A, EV12B et OMGP (Oligodendrocyte-myelin glucoprotein) (Cawthon et al., 1990a). Il n'existe pas aujourd'hui d'arguments permettant d'impliquer l'un de ces trois gènes dans la survenue de manifestations cliniques particulières de la maladie (Wallace et al., 1990a). Un autre pseudogène adénylate-kinase 3 (AK3) a été localisé dans l'intron 39 (Xu et al., 1992).

La taille de l'ARNm correspondant au gène NF1 est de 13 kb. Il comporte une phase ouverte de lecture de 8454 nucléotides et son expression est ubiquitaire, ce qui suggère que l'atteinte prédominante des cellules dérivées des crêtes neurales n'est pas la conséquence d'une simple expression spécifique de tissu (DeClue et al., 1991). Cet ARNm code une protéine de 2818 acides aminés, appelée neurofibromine, d'un poids moléculaire théorique de 327 kDa et localisée dans





Sont indiqués :

- La position des différents locus, les sondes et les enzymes de restriction utilisées pour identifier le gène NF1

<u>Locus</u>	<u>Sonde</u>	<u>Enzyme</u>
D17S33	pHHH202	Rsa I
D17S82	pTH17.19	Bgl II
CRYB1	pB8.2	Msp I
D17S120	pVAW215R3	Taq I
D17S117	pVAW212	Pst I
D17S115	pVAW210M2	Msp I
D17S57	pEW206	Msp I

- Les points des deux translocations : t(1;17) et t(17;22)
- Les trois transcrits exprimés à l'intérieur de l'intron 27 du gène NF1 : OMGP, EV12A, EV12B

**Figure 1 :** Cartographie du chromosome 17 dans la région du gène NF1

le cytoplasme de la plupart des types cellulaires analysés. Par immuno-cytochimie, il a été suggéré que cette protéine cytoplasmique pouvait interagir avec les microtubules du cytosquelette et ainsi intervenir dans la mise en place correcte du programme de division cellulaire (Xu et al., 1990).

Il est intéressant de noter qu'il existe au niveau du domaine GRD (GTP-ase Related Domain) un épissage alternatif de l'exon 23a (constitué de 63 nucléotides) qui génère deux isoformes actives de la neurofibromine: le type 1, correspondant à la séquence classiquement décrite et le type 2, qui possède une insertion de 21 acides aminés. La signification fonctionnelle de cet épissage alternatif, qui est très conservé dans les différentes espèces (homme, souris, poulet) demeure incertaine (Andersen et al., 1993 ; Eisenbarth et al., 1995). Un second épissage alternatif intéressant l'exon 48a (constitué de 54 nucléotides) a été décrit au niveau de la partie C-terminale de la protéine (Marchuk et al., 1991). Le troisième épissage concernant la région 5' conduit au remplacement de 547 des acides aminés de la neurofibromine originale (Danglot et al., 1995). Le tout récent épissage alternatif intéresse encore la région 5' aboutissant à l'insertion de 30 pb entre les exons 9 et 10 (exon 9br) (Danglot et al., 1995).

Les analyses de comparaison de séquence ont permis de reconnaître une région de 360 résidus similaires au domaine catalytique de type GTP-ase des protéines p 120<sup>GAP</sup> de mammifères, Ira 1p, Ira 2p et par Sar I de levure et GAP1 de drosophile (Buchberg et al., 1990). Parmi ces 360 résidus, quinze sont absolument conservés et jouent certainement un rôle fonctionnel important. La fonction commune de ces molécules est de stimuler la conversion de la forme active du RAS liée au GTP en une forme inactive liée au GDP. La neurofibromine est très

certainement impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire en régulant négativement le proto-oncogène  $p21^{\text{RAS}}$  par stimulation de son activité GTPasique intrinsèque. Cependant, il est probable que la neurofibromine exerce d'autres fonctions restant à identifier comme le suggère l'existence de deux régions similaires aux protéines Ira 1p et Ira 2p de levure et s'étendant sur 350 résidus en amont et 860 résidus en aval du domaine GRD (Buchberg et al., 1990).

Récemment, il a été démontré que le gène de la neurofibromine est un gène suppresseur de tumeur et à ce titre, la neurofibromatose de type 1 constitue un modèle d'étude privilégié des conséquences de la transmission d'anomalies moléculaires intéressant un gène suppresseur de tumeur au même titre que le rétinoblastome et la maladie de Li Fraumeni (Legius et al., 1993; Shannon et al., 1994). Environ 5 à 20% des patients atteints de NF1 développent une tumeur maligne. Le plus fréquemment observé est le neurofibrosarcome et il a été suggéré que les dégénérescences d'un neurofibrome s'observeraient plus facilement dans les formes transmises par les femmes permettant d'évoquer des phénomènes d'empreinte parentale (Riccardi, 1992).

L'allèle normal du gène NF1 a été retrouvé muté dans la plupart des tumeurs malignes survenant chez les patients atteints de NF1 : neurofibrosarcomes, phéochromocytomes et schwannomes, démontrant que les mécanismes de la transformation tumorale dans la neurofibromatose sont en accord avec la théorie de Knudson, qui considère que deux mutations sont nécessaires à l'apparition des tumeurs malignes : la première mutation, germinale, est présente dès la conception dans toutes les cellules du sujet et résulte, soit de la transmission par un parent atteint, soit d'une mutation de novo dans les gamètes parentaux. La deuxième mutation,

somatique, survient secondairement dans l'une des cellules cibles et entraîne l'apparition de la tumeur (Knudson, 1971). De plus, très récemment le gène NF1 a également été retrouvé muté dans des tumeurs survenant chez des patients non atteints de NF1 : cancers coliques, astrocytomes, syndrome myélodysplasiques, mélanomes et neuroblastomes (Menon et al., 1990; Riccardi, 1992 ; Shannon et al., 1994).

L'idée d'un rôle suppresseur de tumeur du gène a été supportée par une expérience de fusion cellulaire aboutissant à l'introduction d'un chromosome 17 normal dans une lignée de neuroblastome. La perte de tumorigénicité alors observée dans cette lignée a permis d'impliquer le chromosome 17 dans la perte du phénotype tumoral (DeClue et al., 1992).

Afin de mesurer le taux d'expression du gène NF1 dans les tumeurs, la quantité d'ARN codant pour la neurofibromine a été contrôlée par Northern-blot, le taux d'expression de la neurofibromine est très diminué ou même nul (Buchberg et al., 1990 ; DeClue et al., 1992).

Par ailleurs, le dosage de l'activité p21<sup>RAS</sup> dans les tumeurs associées à une NF1 montre que 30 à 50% de la protéine est sous sa forme active, liée au GTP, alors que dans les cellules NIH 3T3 témoins, le pourcentage est de 2 à 5% (DeClue et al., 1992).

Enfin, des expériences récentes, utilisant un polymorphisme Rsa I exonique, ont permis de démontrer que dans les fibroblastes de NF1, on notait une différence dans les quantités de messagers transcrits à partir de chacun des allèles, l'allèle le plus faiblement exprimé était celui porteur de la mutation (DeClue et al., 1992).

Seules 180 mutations ont été retrouvées pour plusieurs milliers de patients testés. Ces mutations ne touchent pas systématiquement le domaine GAP. L'exon 31 est plus fréquemment touché sans pour cela définir un point chaud. Le promoteur du gène est encore mal connu, ainsi que la région 3' qui n'a pas encore été clonée (Cawthon et al., 1990b; Purandare et al., 1994; Upadhyaya et al., 1995; Shen et al., 1996; Rodenhiser et al., 1997).

La délétion représente 35% de toutes les mutations diagnostiquées. La plus grande délétion s'étend sur 700 kb qui est traduite par la perte d'hétérozygotie chez une famille atteinte de NF1. La plupart des grandes délétions varie de 10 kb à 190 kb. Les petites délétions sont très nombreuses car elles représentent 40 des 63 mutations répertoriées dans cette catégorie. 68% des délétions engendrent un codon stop et terminent prématurément l'expression du gène NF1 (Shen et al., 1996 ; Rodenhiser et al. 1997).

L'insertion est par contre moins fréquente, elle représente seulement 33 mutations, soit 18% de toutes les mutations. La plus grande insertion est de 10 kb. Les grandes insertions sont presque inexistantes, elles représentent seulement 3 mutations de ce genre. Par contre, les petites insertions se rencontrent souvent ; les chercheurs ont décelé 30 petites insertions sur les 33 insertions totales. 75% des petites insertions sont des répétitions de 3 à 4 nucléotides. 85 % de toutes les insertions entraînent l'apparition de codon stop (Shen et al., 1996 ; Rodenhiser et al., 1997).

La substitution d'un nucléotide entraînant l'expression des protéines tronquées du gène NF1 représente 25% de toutes les mutations. La méthylation de la cytosine suivie d'une désamination oxydative conduisant à la transition de C en T est responsable des 30 parmi les 45 mutations signalées dans cette catégorie (Shen et al., 1996 ; Rodenhiser et al., 1997).

La mutation ponctuelle ou la substitution d'un ou plusieurs acides aminés représente 22% de toutes les mutations, soit au nombre de 39. La plupart de changement est de A en G mais le mécanisme de mutation reste obscur. Par contre, il n'y a pas la transition de C en T dans les îlots CpG dans cette subdivision des mutations (Estivill et al., 1991; Shen et al., 1996 ; Rodenhiser et al., 1997).

On trouve dans le génome des gènes inactifs qui ne peuvent être transcrits et traduits en une protéine fonctionnelle. Ils dérivent par mutation d'un gène ancestral actif. Les pseudogènes sont parfois situés à proximité d'autres gènes de la même famille, tous produits à l'origine par duplication. Les pseudogènes sont devenus inactifs à la suite de mutations ayant par exemple aboli les signaux de début de transcription, ou encore modifié les jonctions intron-exon devenues alors non reconnaissables pour l'épissage. D'autres pseudogènes sont dépourvus d'introns et ont été formés par rétrotranscription de l'ARNm puis insertion dans le génome (Kaplan et Delpech, 1994). Des pseudogènes NF1 ont été isolés et localisés respectivement sur le chromosome 2, 12, 14, 15, 20, 21 et 22. L'existence de ces séquences peut compliquer la mise en évidence de réarrangements du locus NF1 (Marchuk et al., 1991, Legius et al., 1992; Cummings et al., 1996).

#### **IV- But et stratégie de l'étude**

Les principaux objectifs de mon projet de recherche sont :

1-D'établir une banque de données sur les manifestations pathologiques de la neurofibromatose de type 1 qui servira à planifier, organiser et maintenir une clinique de NF pour la région de l'Estrie et de déterminer l'importance des manifestations variables de la NF selon la classification des types suggérés par Dr Riccardi, par une étude clinique et paraclinique des familles recensées.

2-D'utiliser les outils de la biologie moléculaire pour offrir un diagnostic présymptomatique, clinique et prénatal, dans le but d'améliorer la classification, les soins aux patients et le conseil génétique. Afin d'atteindre ces objectifs, des marqueurs de polymorphisme de types microsatellites sont utilisés en plus d'un marqueur de type RFLP. À noter que les marqueurs de RFLP ont été le plus souvent utilisés dans l'analyse des haplotypes jusqu'à la découverte des microsatellites qui se sont révélés plus informatifs et plus avantageux. Les microsatellites sont des séquences répétées de nucléotides, bien souvent de type (CA)<sub>n</sub>, qui varient en nombre dans la population; les RFLPs sont des polymorphismes d'un site de restriction. L'avantage majeur des microsatellites par rapport aux RFLPs est qu'ils sont multi-alléliques alors que les RFLPs sont bi-allélique, ce qui les rend beaucoup plus informatifs en terme de pourcentage d'hétérozygotie. Les marqueurs de microsatellites et de type RFLP choisis proviennent du Genbank. Nous avons utilisé ces différents marqueurs pour diagnostiquer l'allèle porteur de la mutation qui est transmis d'un individu à un autre au sein des familles, identifier à l'occasion les mutations de délétions résultant en une perte d'hétérozygotie du locus NF1 et étudier l'informativité des haplotypes par le pourcentage d'hétérozygotie.

3-De rechercher les mutations dans le gène NF1 dans les cas sporadiques. Vu la grande taille du gène NF1 (>300 kb), l'ARNm (13 kb) sera analysé plutôt que le gène au complet limitant la recherche à la région codante. En effet, comme le gène NF1 est exprimé dans les lignées lymphoblastoïdes, il est possible de rechercher les mutations en étudiant l'ARNm extrait de ces lignées, ce qui simplifie grandement l'analyse et autorise la détection de mutations exoniques. Un large répertoire d'oligonucléotides couvrant la totalité de l'ADNc du gène NF1 ont été utilisés afin d'amplifier par PCR l'ADNc au complet. En comparant la taille de chaque produit d'amplification, il est possible d'identifier les mutations de délétion ou d'insertion. Quant aux autres mutations, nous avons essayé la méthode de polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin, la modification du profil de migration électrophorétique sur un gel non dénaturant des fragments d'ADN simple brin (ADN dénaturé) indique la présence des mutations. Le séquençage direct des produits de RT-PCR est la technique idéale pour détecter la mutation de la séquence codante du gène NF1.

Pour ma thèse, nous avons recensé 42 familles atteintes de la neurofibromatose de type 1 comprenant 168 individus dans la clinique NF de l'Estrie. Nous avons choisi d'étudier seize familles NF1 consentantes et disponibles pour le diagnostic moléculaire en utilisant les différents marqueurs. Les résultats obtenus démontrent l'informativité supérieure des microsatellites par rapports aux RFLPs et permettent d'établir le diagnostic présymptomatique et le conseil génétique. Chez deux familles, nous avons observé des cas de perte d'hétérozygotie résultant chaque fois d'une délétion dans le gène NF1. Pour ce qui est de la recherche des mutations dans les cas sporadiques, huit patients seulement répondent aux critères et ont été analysés par RT-PCR. Les mutations identifiées sont récapitulées au tableau 7.



## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **I-La clinique de neurofibromatose de l'Estrie**

Les familles NF1 proviennent de la clinique de neurofibromatose de l'Estrie (Dr Bernard Lemieux et Mme Ginette Plourde), et en collaboration des autres centres cliniques reconnus par le National Neurofibromatosis Foundation (NNFF) au Québec: Clinique de neurofibromatose de l'hôpital de Montréal pour les enfants (Dr June Ortenberg), Institut de recherche neurogénétique clinique de l'hôpital général de Montréal (Drs Guy Rouleau et Von der Kaloustian) et la clinique de neurofibromatose de l'hôpital Sainte-Justine (Dr Albert Labrisseau). Le diagnostic clinique suit les critères du consensus de la conférence du NIH (National Institut of Health). Les malades sont classés selon les stades de gravité reconnus par Dr. Riccardi. Les résultats des examens paracliniques sont acheminés au dossier des patients. Les dossiers sont rentrés et compilés dans le programme informatique "NF Baylor Database". Les statistiques des manifestations pathologiques de la neurofibromatose sont rendues possible grâce à ce logiciel.

Pour les analyses statistiques, nous avons calculé les pourcentages, les moyennes, les écart-types et les modes pour chaque variable. La comparabilité des groupes a été analysée par le test de Student non pairé pour les variables quantitatives, et le test de Khi-deux ( $\chi^2$ ) ou de Fischer pour les variables qualitatives. Les différences sont considérées comme significatives quand les valeurs de p sont inférieures à 0.05 ( $p < 0.05$ ). L'analyse a été effectuée avec le logiciel EpiInfo 6.0 (C.D.C., Atlanta) sur un ordinateur personnel PC.

## **II-Études des haplotypes**

### **II-1-Collecte des échantillons de sang**

Les patients signent le formulaire de consentement éclairé pour la participation volontaire au projet de recherche sur la neurofibromatose. Un échantillon de 20 ml du sang est prélevé pour chaque membre de la famille ainsi que pour les patients sans histoire familiale (cas sporadique). Environ 10 ml de ce sang sont prélevés sur EDTA pour extraire l'ADN afin de faire l'analyse des haplotypes, et 10 autres ml sont prélevés sur acide citrate dextrose et envoyés à l'hôpital général de Montréal pour la transformation et préparation des lignées lymphoblastoïdes. Après transformation, ces lignées sont envoyées dans notre laboratoire où elles sont cultivées afin d'en extraire l'ARN et d'en congeler pour utilisation ultérieure.

### **II-2-Préparation des leucocytes et extraction de l'ADN génomique**

L'ADN génomique est extrait des leucocytes pour déterminer les haplotypes des familles de la façon suivante : à un tube à centrifugation de 15 ml contenant 5 ml d'une solution à base de Ficoll (Histopaque-1077 de Sigma), on dépose soigneusement 10 ml de sang prélevés en présence d'EDTA. Après centrifugation à 1000 rpm pendant 15 min à la température de la pièce, on prélève les globules blancs à l'interface entre le plasma (couche supérieure) et la solution d'Histopaque contenant les globules rouges (couche inférieure). Les globules blancs sont ensuite lavés une fois délicatement par aspiration douce avec 10 ml de PBS (200 mM KCl, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 15 mM NaCl) pour débarrasser du plasma et du Ficoll. Les leucocytes sont recueillis par centrifugation à 1000 rpm pendant 15 min à 20°C puis resuspendus dans 6 ml de NaCl hypotonique 0.2% afin de lyser les globules rouges restants. Après 1 min 30 sec à la

température ambiante, on rajoute 6 ml de NaCl hypertonique 1.6%, on mélange par renversements et on recueille les leucocytes par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min à la température du laboratoire. Les leucocytes sont resuspendus dans 2 ml de PBS et comptés avec un hémacytomètre. Les leucocytes sont ensuite aliquotés à raison de  $2 \times 10^6$  cellules par tube. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 5 min à la température ambiante, les culots de leucocytes sont congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

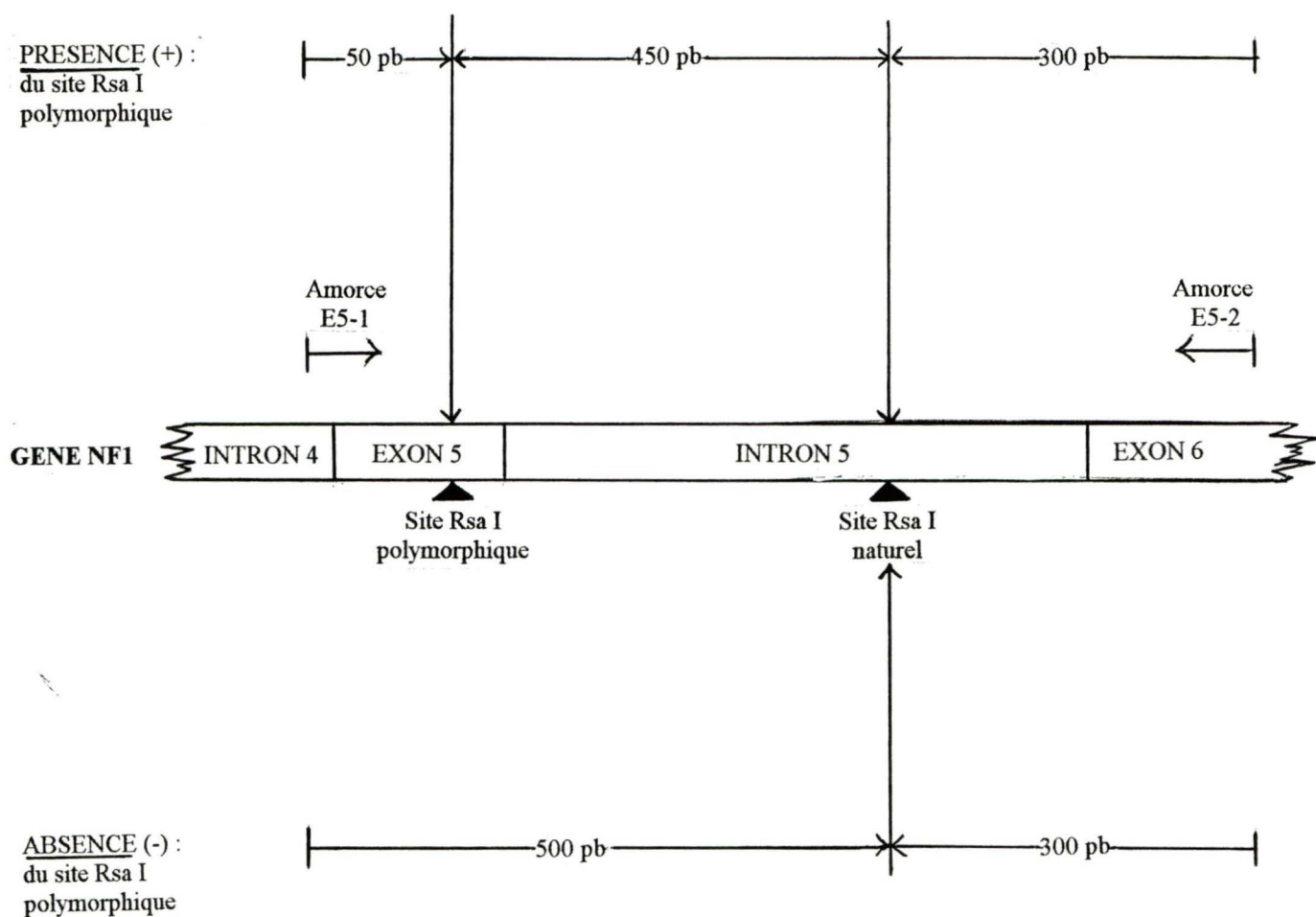
Pour extraire l'ADN génomique des leucocytes, ceux-ci sont lysés dans 500  $\mu\text{l}$  de tampon NE (105 mM NaCl, 26.38 mM EDTA pH 8.0) avec 0.5% de SDS et 200  $\mu\text{g/ml}$  de protéinase K dans un bain marie à  $50^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. Le lendemain, l'ADN est extrait une fois avec du phénol puis deux fois avec du phénol:chloroforme:isoamyl alcool (25:24:1). Pour chaque extraction, les solutions sont agitées par retournement, centrifugées 5 min à 12000 rpm, puis le surnageant est récupéré avec un embout coupé pour éviter de briser l'ADN. Finalement, chaque solution est extraite trois fois avec 250  $\mu\text{l}$  de chloroforme. À la phase aqueuse, on ajoute 1/2 volume d'acétate d'ammonium 7.5 M, on mélange par retournement puis on ajoute deux volumes d'éthanol 100% à la température du laboratoire. On laisse la méduse se former en agitant doucement par rotation, puis on la récupère à l'aide d'une pipette pasteur fermée au bout et on lave deux fois dans de l'éthanol 70%, Après avoir laissé sécher l'ADN sur la pipette, on le resuspend dans 300  $\mu\text{l}$  d'eau bidistillée stérile pendant deux jours à  $4^{\circ}\text{C}$ . La concentration de l'ADN est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à une concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN double brin. Cet ADN est utilisé pour les PCR.

### **II-3-Le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP)**

Le polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) utilisé est un site de restriction pour l'enzyme RsaI dans l'exon 5 du gène NF1 (Hoffmeyer et Gunter, 1994a). Deux amorces d'oligonucléotides 5E-1 (5'-CATGTGGTTCTTTATTTATAGC-3') : situé dans l'intron 4 sauf pour le GC dans l'exon 5 et 5E-2 (5'-TCAATCGTATCCTTACCAGCC-3') : localisé dans l'exon 6 sont utilisées pour amplifier une région de 800 pb couvrant l'exon 5, l'intron 5 et une partie de l'exon 6.

L'amplification par PCR est faite dans 50 µl contenant 500 ng d'ADN génomique, 200 nM de chaque amorce (5E-1 et 5E-2), 200 µM dNTP, 1 X tampon PCR (10X tampon PCR : 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris HCl pH 8.0, 500 mM KCl) et 1.5 U Taq polymérase (Pharmacia). Les conditions de PCR sont les suivantes: une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivie de 35 cycles aux températures suivantes : dénaturation 1min à 94°C, appariement à 52°C pendant 1 min et une synthèse à 72°C pendant 1 min 30 sec dans un thermocycle (PTC-100 @ Programmable Thermal Controler, MJ Research), les cycles se terminent par une élongation finale à 72°C pendant 10 min, puis le tout est conservé à 4°C.

25 µl des produits d'amplification par PCR ont été digérés par 2 U de Rsa I (Pharmacia) à 37°C pendant 3 heures dans un volume de 50 µl contenant 1X tampon One-Phor-All (100 mM Tris-acétate pH 7.5, 100 mM magnésium acétate et 500 mM potassium acétate).



**Figure 2 :** Polymorphisme de longueur de fragments de restriction

Schéma illustrant le polymorphisme de longueur de fragments de restriction au niveau de l'exon 5 avec l'enzyme de restriction Rsa I du gène NF1. Le couple d'amorce (5E-1 et 5E-2) synthétise un fragment de 800 pb. La présence (+) du site polymorphique donne trois fragments de 450 pb, 300 pb et 50 pb. L'absence (-) du site polymorphique Rsa I signifie la constatation de deux fragments de 500 pb et 300 pb sur un gel d'agarose.

Les fragments digérés ont été séparés par un gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (0.5 µg/ml) dans le tampon TBE (Sambrook et al., 1989). Les fragments ont été visualisés sous U.V. et photographiés avec l'appareil Polaroid 57. La présence (+) du site de restriction donne trois fragments de 450, 300, 50 pb ; l'absence (-) signifie la constatation de deux fragments de 500 et 300 pb (Figure 2). Les résultats sont identifiés et rapportés aux arbres généalogiques de chaque famille.

#### **II-4-Les microsatellites**

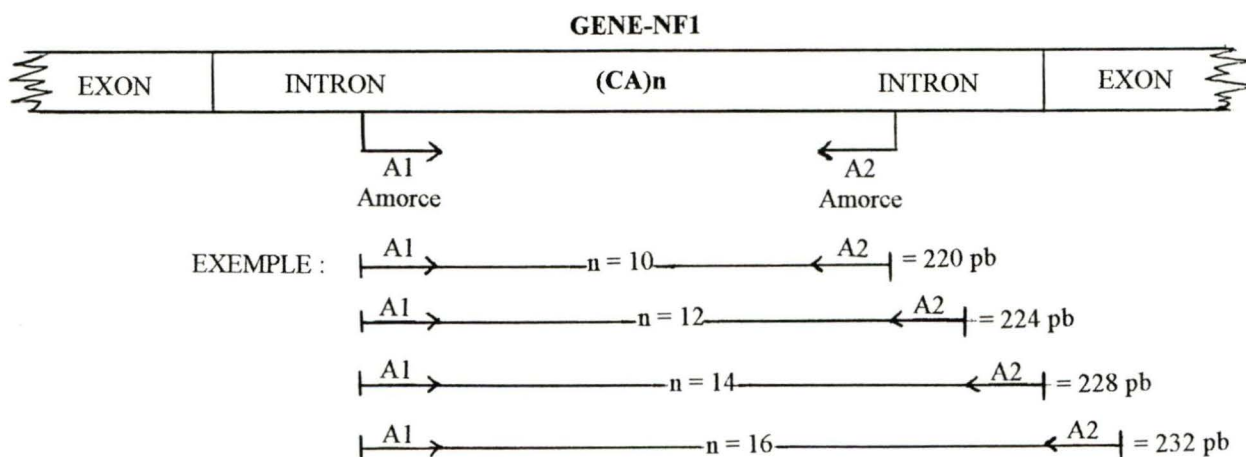
Il existe dans les introns 26, 27 et 38 du gène NF1 plusieurs microsatellites de type répétition du dinucléotide CA ou une autre combinaison. Nous avons synthétisé des amorces de PCR encadrant chacun des microsatellites (Tableau 2).

Les PCRs ont été réalisés dans un volume de 20 µl contenant 500 ng de l'ADN génomique, 1 X tampon PCR (10 X tampon PCR: 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 µM dNTP, 20 µM de chaque amorce, 1 µl (α-<sup>32</sup>P) dCTP: 10 µCi/µl (Amersham 3000 Ci/mme, 25 µCi/µl) et 0.5 U de Taq polymérase (Pharmacia) et H<sub>2</sub>O qsp. Les 30 cycles de PCR comprennent: une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une hybridation qui varie de 52 °C à 58°C pendant 30 sec et enfin, une polymérisation à 72°C pendant 1 min + 1 sec à chaque cycle. Les cycles sont précédés d'une dénaturation initiale de 5 min à 94°C et suivis d'une élongation finale de 7 min à 72°C. L'échantillon est ensuite gardé à 4°C. Les différentes étapes sont réalisées automatiquement à l'aide d'un thermocycle (PTC-100®). Le tableau 2 regroupe les différents marqueurs de microsatellites utilisés pour l'identification des haplotype, avec les diverses températures d'appariement des oligonucléotides.

Nom des amorces	Séquences des oligonucléotides	Type de répétition	Localisation	Température d'appariement	Taille des produits
26I-1	5'AGGCCAGGAGTTCAAGACCA3'	(TAGA)	Intron 26	58°C	200 pb
26I-2	5'ATGAGCCACTGTGCCCAATC3'				à 240 pb
27III-1	5'TGAAGTATGCAGTTTTCAG3'	(CA)	Intron 27	55°C	213 pb
27III-2	5'GGCTAAGTGTAACGCAAAG3'				à 245 pb
27IV-1	5'TAGATTATATGGGACAGAAAATG3'	(CA)	Intron 27	55°C	104 pb
27IV-2	5'CTTGAGGTGATGACAGGATG3'				à 132 pb
38I-1	5'CAGAGCAAGACCCTGTCT3'	(CA)	Intron 38	52°C	171 pb
38I-2	5'CTCCTAACATTTATTAACCTTA3'				à 191 pb

**Tableau 2** : Les microsatellites au niveau du gène NF1.

Les noms et les séquences des oligonucléotides utilisés pour synthétiser les microsatellites au niveau du gène NF1 dans l'étude des haplotypes avec leurs températures d'appariement respectives et la taille des fragments amplifiés (Lazaro et al., 1993; Grifa et al., 1995; Valero et al., 1996)



**Figure 3** : Les microsatellites

Schéma illustrant la variation du nombre des nucléotides répétitifs entraînant les différentes tailles des fragments synthétisés par PCR au sein de la population.

Les produits d'amplification pour les marqueurs de microsatellites sont analysés par électrophorèse sur gel à 8% d'acrylamide dénaturant en présence de 4 M urée. Une séquence référence de pUC 18 servant d'échelle de poids moléculaire a migré sur gel en même temps. Le gel dénaturant permet de séparer et de distinguer des fragments variant d'un nucléotide. La préparation du gel dénaturant, ainsi que les conditions d'électrophorèse ont été tirées du manuel d'instructions du kit de séquençage de la compagnie Pharmacia (T7 Sequencing Kit). Les produits d'amplification des microsatellites ont été ajoutés de 5 µl de la solution stop (T7 Sequencing Kit, Pharmacia) et 3 µl du mélange ont été chargés sur gel. Le plasmide pUC 18 a été extrait de la bactérie *Escherichia Coli* selon la méthode des mini-préparations décrite dans Maniatis (Sambrook et al., 1989) et a été séquençé selon la procédure du kit de séquençage de Pharmacia en utilisant du ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )dCTP (Amersham 3000 Ci/mmmole, 25 µCi/µl). Environ 3 µl de chaque réaction de séquence de pUC 18 ont été introduits dans chaque puits du gel. Le temps d'électrophorèse et le voltage varient selon la taille du produit d'amplification.

Après électrophorèse, une exposition pendant 24 heures a été effectuée dans une cassette sans écran intensifiant. Les bandes correspondant aux différents allèles sont localisées sur gel en se référant à leur taille et à l'échelle fournie par la séquence du pUC 18. Chaque allèle a été identifié selon le poids moléculaire obtenu et le résultat a été rapporté aux arbres généalogiques de chaque famille afin d'identifier l'allèle porteur de la mutation (Figure 3).



### **III-Détection des mutations du gène NF1**

#### **III-1-La préparation des lignées lymphoblastoïdes**

Les lignées lymphoblastoïdes ont été établies à l'Hôpital général de Montréal par transformation des cellules lymphocytes du sang des patients (20 ml prélevés sur acide citrate dextrose dans des conditions stériles et maintenus à température ambiante) par le virus d'Epstein-Barr, en présence de cyclosporine A (0.1 µg/ml de culture) et cultivées à 37°C, avec 5% du CO<sub>2</sub>, en milieu Iscove (Gibco BRL) additionné de 20% de serum de veau foetal, glutamine et antibiotiques (Gentamicine, Pénicilline et Streptomycine). Les cellules lymphoblastoïdes ont été cultivées en milieu Iscove (Gibco BRL) avec 10% de sérum foetal de veau et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Des aliquots de  $2 \times 10^6$  cellules ont été conservés par congélation dans l'azote liquide dans un milieu Iscove avec 20% de sérum de veau foetal et 10% DMSO (Diméthyl Sulfoxide). La congélation est graduelle à raison de 1°C par minute. Un instrument de Honeywell a permis de contrôler la température des échantillons ainsi que la vitesse de congélation. Les cellules congelées ont permis de conserver du matériel pour chaque proposant et de préparer de l'ARN pour les études fonctionnelles et la recherche des mutations du gène NF1.

D'autres aliquots de  $2 \times 10^6$  cellules ont été aussi congelés à -20 °C sous forme de culots cellulaires de lymphocytes.  $2 \times 10^6$  cellules dans 2ml de culture ont été centrifugées pendant 5 min à 12000 rpm et à la température de la pièce. Le surnageant éliminé, le culot de cellules est lavé avec 1 ml de PBS. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 2 min à la température du laboratoire, le culot est conservé à -20°C pour en extraire l'ARN et l'ADN.

### **III-2-L'extraction des ARNs des lignées lymphoblastoïdes**

Les ARNs totaux ont été extraits à partir des lignées lymphoblastoïdes en utilisant la méthode du Trizol® (Gibco BRL), qui est la version commerciale du protocole décrit par Chomczynski et Sacchi.

Après centrifugation des cellules en culture et au lavage au PBS, environ  $3 \times 10^6$  cellules ont été lysées dans 0.5 ml de Trizol (solution à base de phénol monophasique et d'isothiocyanate de guanidine) en mélangeant vigoureusement. Après 5 min à la température du laboratoire, on ajoute 250 µl de chloroforme. Le tout est vortexé pendant 30 sec, incubé 5 min à 0°C, puis centrifugé durant 15 min à 4°C. Les ARNs sont récupérés dans la phase aqueuse alors que l'ADN et les protéines se retrouvent dans la phase inférieure de couleur rouge. Les ARNs sont précipités avec 500 µl d'isopropanol et gardés à 0°C pendant 15 min, puis culottés par centrifugation 15 min à 12000 rpm et à 4°C. Les culots sont rincés deux fois à l'éthanol-H<sub>2</sub>O-DEPC 75% (Sambrook et al., 1989) puis centrifugés pendant 5 min à 12000 rpm et à 4°C. Les culots sont ensuite séchés sous vide et dilués dans 20 µl d'eau bidistillée stérile traitée avec 1% de diéthylpyrocarbonate (H<sub>2</sub>O-DEPC).

La quantification des ARNs s'effectue par spectrophotométrie à 260 nm, une unité de D.O. correspond à 40 µg/ml d'ARN. La qualité des ARNs est déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, un marqueur de taille est déposé sur le même gel afin d'identifier les bandes des ARNs 28 S et 18 S. Ces ARNs sont conservés à -20°C pour faire le RT-PCR.

### **III-3- La rétrotranscription (RT)**

À partir des ARNs , on synthétise les ADNc correspondants à l'aide de la reverse transcriptase. 1 µg d'ARN total est rétrotranscrit en ADNc dans un volume de 20 µl contenant 4 µl de tampon 5X de réaction (AMV RT 5X tampon de réaction de Promega : 250 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT et 2.5 mM spermidine), 2 µl de DTT (0.11 M), 1 µl de chaque dNTP (10 mM), 1 µl d'amorce hexamérique pd(N)<sub>6</sub> de Pharmacia (50 µM) et 1 µl d'enzyme reverse transcriptase (AMV Reverse transcriptase de Promega : 5 U/µl). Le programme de transcription inverse est : 10 min à 20°C, suivi d'une heure à 37°C, puis le tout est conservé à 4°C.

### **III-4-Les PCRs de l'ADNc du gène NF1**

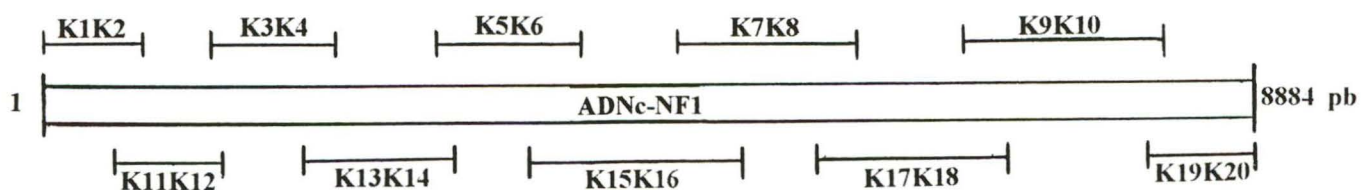
Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces d'oligonucléotides spécifiques au gène NF1. Les couples d'amorces utilisés sont tirés de l'article de Hoffmeyer et al. (Hoffmeyer et al., 1994b). Les séquences de ces couples, la position, ainsi que la taille de leurs produits d'amplifications se retrouvent au tableau 3 et à la figure 4.

L'amplification par PCR est effectuée dans un volume final de 50 µl qui contiennent: 5 µl de produit de rétrotranscription (ADNc), 200 µM dNTP, 200 nM chaque couple d'amorces, 1X tampon PCR (10 X tampon PCR: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 U de Taq polymérase et H<sub>2</sub>O qsp 50 µl.

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques	Température d'appariement	Taille des produits
<b>K1</b> <b>K2</b>	5'GGACATGGCCGCGCACAG3' 5'GCTAACTGCGCAACCTTCTTT3'	54°C	635 pb
<b>K3</b> <b>K4</b>	5'AGATAACTCTGTCATTTTTCCTAC3' 5'CTATCCATAGAGGAGTTCCT3'	54°C	995 pb
<b>K5</b> <b>K6</b>	5'CTGTATCCAATGCTATTTAACAAA3' 5'AGAGCCATCGCTATAGGGAG3'	50°C	895 pb
<b>K7</b> <b>K8</b>	5'CAGAGCACAAACCTGTGGCA3' 5'TCTAACGTGAGGTGTGGCTC3'	56°C	1132 pb
<b>K9</b> <b>K10</b>	5'CCAGTGGACAGAACTAGCTC3' 5'TGGCCTCTGCTAAGTATTCATA3'	54°C	1258 pb
<b>K11</b> <b>K12</b>	5'TAGTCGCATTTCTACCAGGTTA3' 5'GAGAATGGCTTACTTGGATTAAA3'	54°C	632 pb
<b>K13</b> <b>K14</b>	5'TCCTTCTAGTGGAAATACCACT3' 5'GCTGCCTTCAGTATGATTATCT3'	54°C	1035 pb
<b>K15</b> <b>K16</b>	5'GCACTCCATAGGCTTAGGTTA3' 5'TCCCAGCTTTGGAAGTCCCA3'	54°C	1261 pb
<b>K17</b> <b>K18</b>	5'GTGCCTTAACCTTGTACCTTTAAT3' 5'TTATCTGCCCATGAGACACTC3'	54°C	1160 pb
<b>K19</b> <b>K20</b>	5'CTGTTCTAGCTACACTGGTAAA3' 5'GGCTTCGAAGAGTTGATCATC3'	50°C	875 pb

**Tableau 3 :** Amplification par PCR de l'ADNc du gène NF1.

Les noms et les séquences des amorces utilisées dans l'amplification de l'ADNc avec les températures d'appariement et les tailles des produits synthétisés (Hoffmeyer et al., 1994b).



**Figure 4 :** Amplification par PCR de l'ADNc du gène NF1

Schéma illustrant la position des dix couples d'oligonucléotides et les différents fragments synthétisés par PCR de l'ADNc du gène NF1.

Les 30 cycles de PCR se sont déroulés comme suit: une dénaturation à 93°C pendant 1 min, une hybridation qui varie de 50°C à 54°C pendant 1 min et une polymérisation à 72°C pendant 2 min. Les cycles sont précédés d'une dénaturation initiale de 5 min à 96°C et sont suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 10 min, puis le tout est conservé à 4°C.

Les différents fragments amplifiés par RT-PCR, correspondant aux personnes NF1 sporadiques et à un individu comme contrôle, sont d'abord vérifiés sur gel d'agarose 1% en tampon TBE puis électroélués selon la méthode décrite dans Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) afin de débarrasser les artefacts de PCR. Les fragments électroélués sont alors analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide 5% non dénaturant en tampon TBE pour rechercher les petites délétions ou insertions, et sur un gel d'agarose 1% en tampon TBE pour la recherche des grandes délétions ou insertions, en présence de marqueurs de poids moléculaire. En comparant les différents types, il est théoriquement possible d'identifier la présence d'une délétion ou insertion dans la région analysée. Les fragments suspects sont séquencés directement pour identifier la nature et la localisation des mutations.

Nous avons établi une carte de restriction de l'ADNc du gène NF1 par un programme informatique Vector NTI 4.0 (Informax, USA). Toutes les digestions enzymatiques sont effectuées selon les recommandations des fabricants. L'objectif de cette expérience est de vérifier si on amplifie des bons fragments, d'obtenir des fragments de faible poids moléculaire pour d'autres études et surtout de rechercher les mutations causées par une altération des sites de restrictions ou modifications des tailles de fragments digérés.

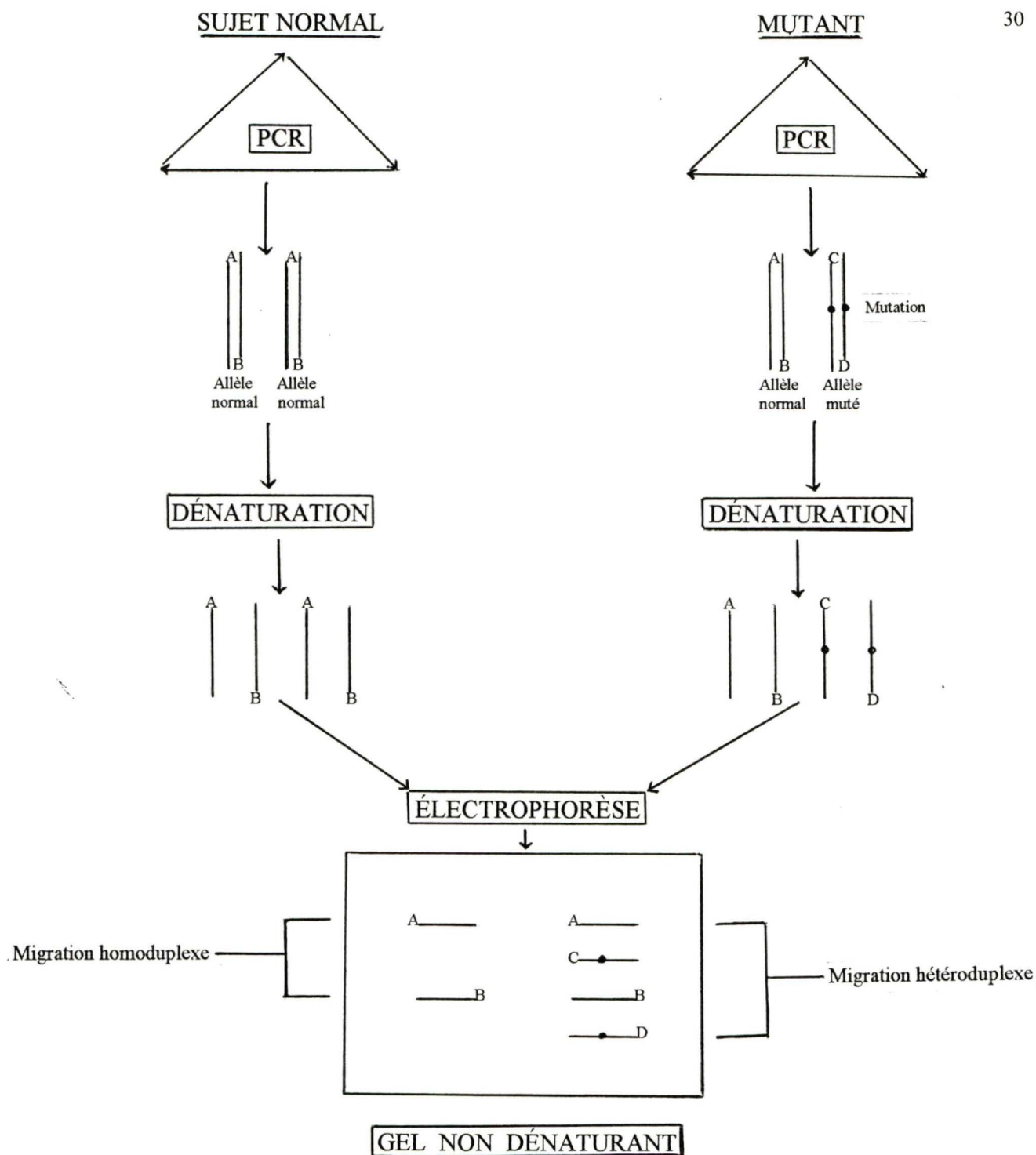
### **III-5-Le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin( SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism)**

Tous les produits de RT- PCR synthétisés par les 10 couples d'amorces avec les 8 patients NF1 sporadiques et un individu sain comme contrôle ont été analysés par cette expérience. Le marquage radioactif des produits d'amplification se fait seulement en ajoutant 1  $\mu$ l ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (Amersham 3000 Ci/mmole, 25  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) à la réaction de PCR initial. Les conditions de PCR sont déjà décrites au chapitre III-4

1  $\mu$ l de produits de PCR est dénaturé par 1  $\mu$ l d'une solution composée de 95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% de bromophénol bleu et 0.05% de xylène. Le mélange a été incubé à 100°C pendant 4 min et refroidi immédiatement dans la glace.

Les aliquots dénaturés (2  $\mu$ l) sont immédiatement analysés sur un gel polyacrylamide 5% non dénaturant dans un tampon TBE (Sambrook et al., 1989). L'électrophorèse se fait à voltage constant. Le gel est séché et exposé une nuit à + 4°C au contact d'un film autoradiographique Kodak.

Une variation de séquence aussi minime qu'une mutation ponctuelle peut se manifester par une différence conformation, entraînant une différence de migration dans une électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide (Figure 5). Tous les fragments suspects sont séquencés directement pour savoir la position, la nature et la conséquence des mutations identifiées.



**Figure 5:** Mise en évidence d'une mutation par SSCP

L'ADN est d'abord amplifié par PCR avec marquage au  $^{32}\text{P}$ . Les produits sont dénaturés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Au moment de la décongélation chaque brin se renature sur lui-même en prenant une conformation spécifique. Si une mutation modifie la conformation du monobrin, il en résulte une différence de migration.

## **II-6-Le séquençage**

Les fragments d'ADN révélant un profil altéré après électrophorèse sur gel, un profil de migration de type hétéroduplexe après le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin et les produits de PCR englobant le domaine GRD pour certains patients ont été séquencés directement. Les produits d'amplification par RT-PCR en question sont déposés sur gel d'agarose 1% dans un tampon TBE. Après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium à 2 µg/ml, les bandes sont visualisées sous U.V.. La récupération des fragments d'ADN voulus à partir des gels se fait par découpage de la bande correspondante suivi d'une électroélution (Sambrook et al., 1989).

Le séquençage d'ADN est fait selon la méthode enzymatique (Sanger et al., 1977) et en utilisant le kit de séquençage de la compagnie Pharmacia (T7 Sequencing Kit). Les réactions de séquence, la préparation des gels de polyacrylamide et l'électrophorèse sont faites comme recommander dans le protocole fourni par le manufacturier. Par la suite, les gels sont immergés sous agitation légère dans une solution 10% méthanol et 10% acide acétique glacial pour retirer l'urée présente dans le gel. Puis le gel est séché et autoradiographié avec un film Kodak.

L'analyse et le traitement des séquences sont effectués en comparant les séquences lues à la séquence de l'ADNc du gène NF1 dans la banque de données du Genbank.



## **RÉSULTATS**

### **I-Caractéristique de la clinique de neurofibromatose de l'Estrie.**

La clinique de neurofibromatose de l'Estrie a réuni 42 familles qui regroupent 168 individus, dont 88 (52.38%) de sexe féminin et 80 (47.62%) de sexe masculin. 62 individus sont atteints de la maladie, ce qui représente 36.90%, dont 32 (19.04%) de sexe féminin et 30 (17.86%) de sexe masculin. Les autres 106 individus qui ne présentent pas le symptôme de la neurofibromatose de type 1, ce qui représente 63.10% des gens de la clinique de neurofibromatose, dont 62 (36.90%) de sexe féminin et 44 (26.20%) de sexe masculin. L'âge moyen des patients est environ 11 ans ( $10.8 \pm 2.6$  ans) contrairement à 16 ans ( $15.34 \pm 4.2$  ans) de l'ensemble des individus de la clinique. 60% d'entre eux proviennent de la région sherbrookoise.

Les taches café au lait sont retrouvées sur 90% (56 individus) des patients et 98% des motifs de la première consultation à la clinique de NF sont représentés par ce même symptôme. 20 individus atteints de la maladie ont passé les examens ophtalmologiques et les nodules de Lisch sont diagnostiqués seulement chez 10 patients. Les lésions sont retrouvés chez 10% des cas. 25% des patients sont classés au stade 1, 32% au stade 2, 35% au stade 3 et enfin 8% au stade 4, c'est-à-dire la majorité (67% = 42 patients) de nos patients sont classés au stade de gravité moyenne. Les neurofibromatomes sont décelés chez 2% des cas seulement et nous avons recensé un cas de neurofibrosarcome. Par contre, 10% des enfants ont présenté un retard de développement. Des troubles visuels et auditifs sont diagnostiqués chez 8% des cas respectivement.

Par ailleurs, 12% des enfants malades présentent un certain retard scolaire. La déformation osseuse de type scoliose est décelée chez 5% des cas. Les caries dentaires sont retrouvées chez 7% des enfants atteints de neurofibromatose. La macrocéphalie est signalée chez 8% des cas. Les problèmes chirurgicaux ont affecté environ 10% des patients et 12% ont présenté d'autres problèmes médicaux.

## **II-Le diagnostic moléculaire indirect**

### **II-1-Études des haplotypes**

Nous avons étudié 16 familles comprenant 75 individus, dont au moins un membre était atteint de NF1. Parmi ces familles, on dénombre 15 cas familiaux et un cas sporadique (Famille "F"). Les cas familiaux représentent des cas idéaux pour l'établissement d'un diagnostic présymptomatique parce que chacune d'elles comprenait au moins un individu atteint de la neurofibromatose de type 1 et un ou plusieurs personnes ne présentent pas les symptômes de la maladie. Le cas sporadique est étudié quand même pour essayer de trouver une délétion grâce à la perte d'hétérozygotie possible.

Comme on le verra, les cinq marqueurs génétiques utilisés ont permis d'identifier l'allèle porteur de la mutation causale de la maladie et de diagnostiquer chez deux familles (Familles "H" et "L") la présence de deux mutations de délétions dues à la perte d'hétérozygotie.

Pour les sujets identifiés comme porteur d'une mutation ou d'une perte d'hétérozygotie, le diagnostic clinique concordait parfaitement avec nos résultats, c'est à dire que les symptômes de la maladie étaient présents chez toutes les personnes porteuses de l'allèle muté, à l'exception

d'une famille "M" (Figure 18) où nous avons identifié un individu porteur de l'allèle muté mais sans manifestation clinique objective de la maladie donc un cas asymptomatique.

Les figures 6 à 21 montrent les arbres généalogiques des 16 familles étudiées ainsi que leurs haplotypes déterminés par les marqueurs génétiques. Les polymorphismes utilisés sont 5E, 26I, 27III, 27IV et 38I, qui sont localisés respectivement dans l'exon 5, dans l'intron 26, dans l'intron 27 et dans l'intron 38. Les conditions de PCR afin d'amplifier ces régions polymorphiques sont déjà décrit dans la section matériel et méthodes.

Les individus sont identifiés par un code génétique (code en chiffre romain suivi de deux points et un chiffre arabe, exemple : I:1) et par un numéro d'ordre (numéro d'entrée au registre de laboratoire en chiffre arabe). Les chiffres dans les arbres généalogiques indiquent la taille en nucléotide de chaque région polymorphique amplifiée par PCR avec les marqueurs utilisés. La photographie des gels représente les résultats obtenus avec chaque membre de la famille. Sur ces gels, ce sont les bandes les plus intenses qui correspondent aux allèles des individus. Les autres bandes moins intenses sont les résultats des erreurs de Taq polymérase qui peut parfois ajouter ou omettre des nucléotides. Ce phénomène est souvent observé lors de l'amplification des microsatellites de répétitions (CA) et plus rarement dans les répétitions de quatre nucléotides ou plus (TAGA, TAGG, TAAGA). Concernant le RFLP, l'absence d'une bande à 800 pb correspondant au produit de PCR, démontre que la digestion de ce fragment par Rsa I est complète. En cas de présence (+) du site Rsa I polymorphique, on remarque seulement la présence de deux bandes à 450 pb et 300 pb, la bande 50 pb est sortie rapidement du gel.

### **II-1-1-Famille "A"** (Figure 6)

Le père (I:1, 1), qui est atteint de la maladie, porte les allèles (-, 226, 227, 106, 185 / -, 226, 221, 106, 181) ; la mère (I:2, 2), qui n'est pas atteinte, porte les allèles (-, 226, 227, 112, 185 / -, 222, 221, 106, 185). La fille (II:1, 3) est malade parce qu'elle a hérité l'allèle porteur de la maladie de son père (-, 226, 221, 106, 181) et l'autre allèle est celui de sa mère (-, 226, 227, 112, 185). De même pour le fils (II:2, 4), il est atteint de neurofibromatose, il a reçu l'allèle anormal venu de son père (-, 226, 221, 106, 181) et l'autre venu de sa mère (-, 222, 221, 106, 185).

Pour cette famille donc, l'allèle porteur de la mutation est (-, 226, 221, 106, 181) parce qu'on retrouve cet allèle chez les individus atteints de la maladie (I:1, 1; II:1, 3 et II:2, 4).

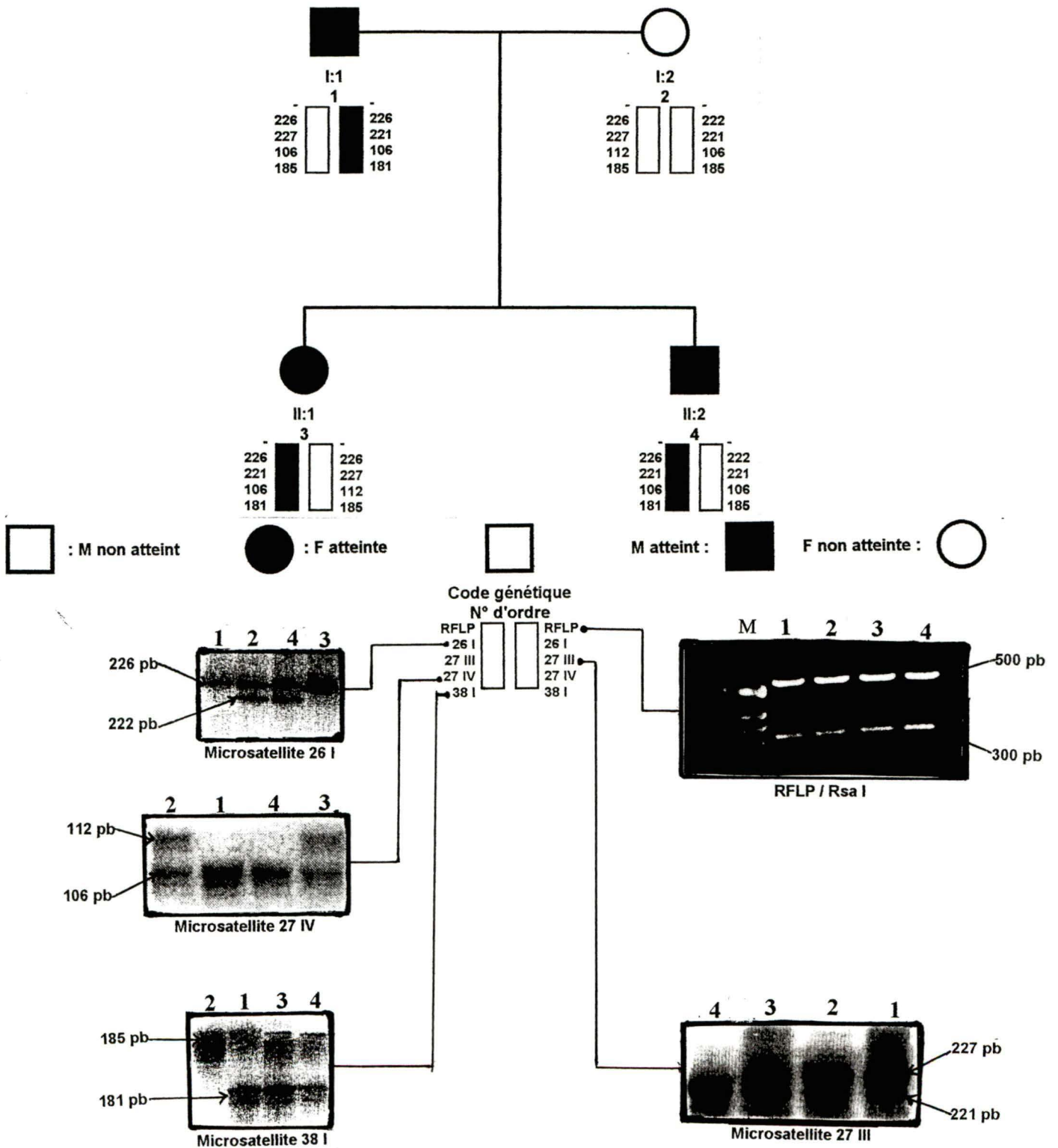
### **II-1-2-Famille "B"** (Figure 7)

La mère (I:2, 6) est atteinte de la neurofibromatose et porte les allèles (-, 222, 227, 108, 181 / -, 222, 221, 112, 187) ; son mari (I:1, 5) est sain et ses allèles (+, 226, 227, 112, 187 / -, 226, 221, 108, 187). Le fils (II:1, 7) est atteint de la maladie parce qu'il a hérité un allèle porteur de la maladie de sa mère (-, 222, 227, 112, 187) et l'autre allèle provient de son père (-, 226, 221, 108, 187). Par contre, sa fille (II:2, 8), elle est saine ; elle a reçu l'autre allèle normal de sa mère (-, 222, 227, 108, 181) et un allèle de son père pour compléter (+, 226, 227, 112, 187).

Pour cette famille, la présence de l'allèle (-, 222, 227, 116, 187) signifie expression de la maladie de neurofibromatose parce que la neurofibromatose est une maladie autosomique dominante.

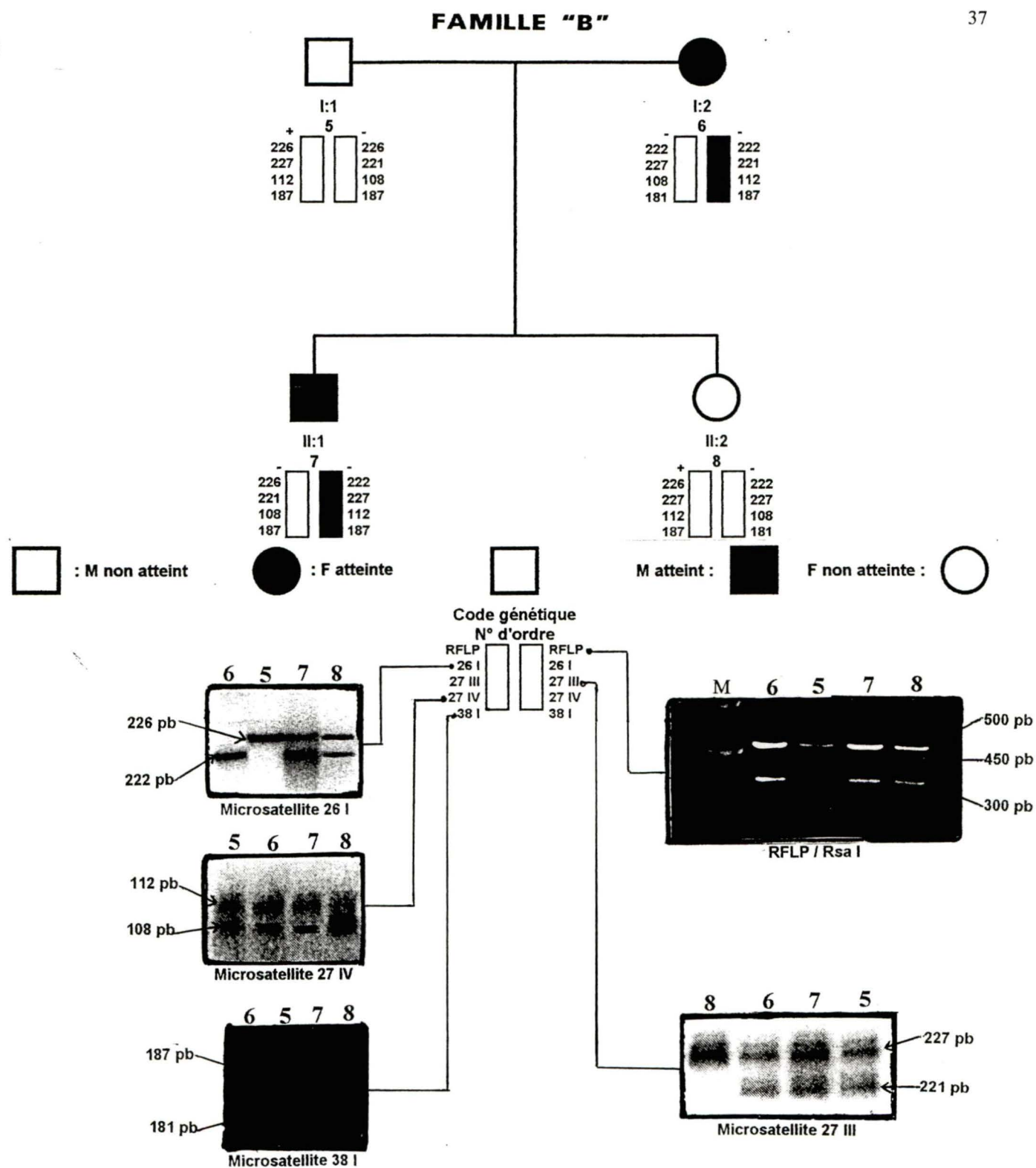
# FAMILLE "A"

36



**Figure 6 :** Haplotype de la famille "A"

L'allèle en noir (-, 226, 221, 106, 181) est porteur de la mutation responsable de la maladie.



**Figure 7 :** Haplotype de la famille "B"  
 L'allèle en noir (-, 222, 227, 112, 187) est porteur de la mutation responsable de la maladie.

### **II-1-3-Famille "C"** (Figure 8)

Les patientes étiquetées (I:2, 10) et (I:3, 11) sont deux soeurs. Elles portent les même allèles (-, 226, 227, 112, 185 / -, 222, 221, 112, 181). L'un des deux allèles est donc porteur de la maladie de Von Recklinghausen. Pour le déterminer, il suffit de regarder les allèles des enfants atteints de NF1. Pour la patiente (I:1, 10), sa fille (II:2, 14) est atteinte et porte un allèle malade (-, 222, 221, 112, 181), l'autre allèle est celui de son père (-, 226, 227, 112, 181). Pour la patiente (I:3, 11), son garçon (II:4, 16) est atteint de la maladie, il a hérité l'allèle anormal de sa mère (-, 222, 221, 112, 181) et l'autre provenant de son père (-, 222, 227, 108, 185).

Pour cette famille, le diagnostic est fait : l'allèle (-, 222, 221, 112, 181) est marque de la transmission de la maladie. L'allèle (-, 226, 227, 112, 185) est normal pour les deux patientes (I:2, 10) et (I:3, 11) ; cette remarque est confirmée par l'absence de la maladie chez les individus (II:1, 13) et (II:3, 15).

### **II-1-4-Famille "D"** (Figure 9)

La mère (I:1, 17) est atteinte de NF1 et a comme allèles (-, 222, 225, 108, 185 / -, 222, 227, 108, 185). Son fils (II:2, 20) est atteint de la maladie parce qu'on trouve l'allèle responsable de la NF1 provenant de sa mère (-, 222, 225, 108, 185), l'autre allèle provenant de son père, est sain (-, 222, 227, 116, 185). L'allèle (-, 222, 225, 108, 185) signifie NF1 pour cette famille. L'autre allèle de la mère (-, 222, 227, 108, 185) est sain ; la preuve, c'est que sa fille (II:1, 19) n'est pas malade. Elle porte les allèles (-, 218, 225, 108, 181 / -, 222, 227, 108, 185).

## FAMILLE "C"

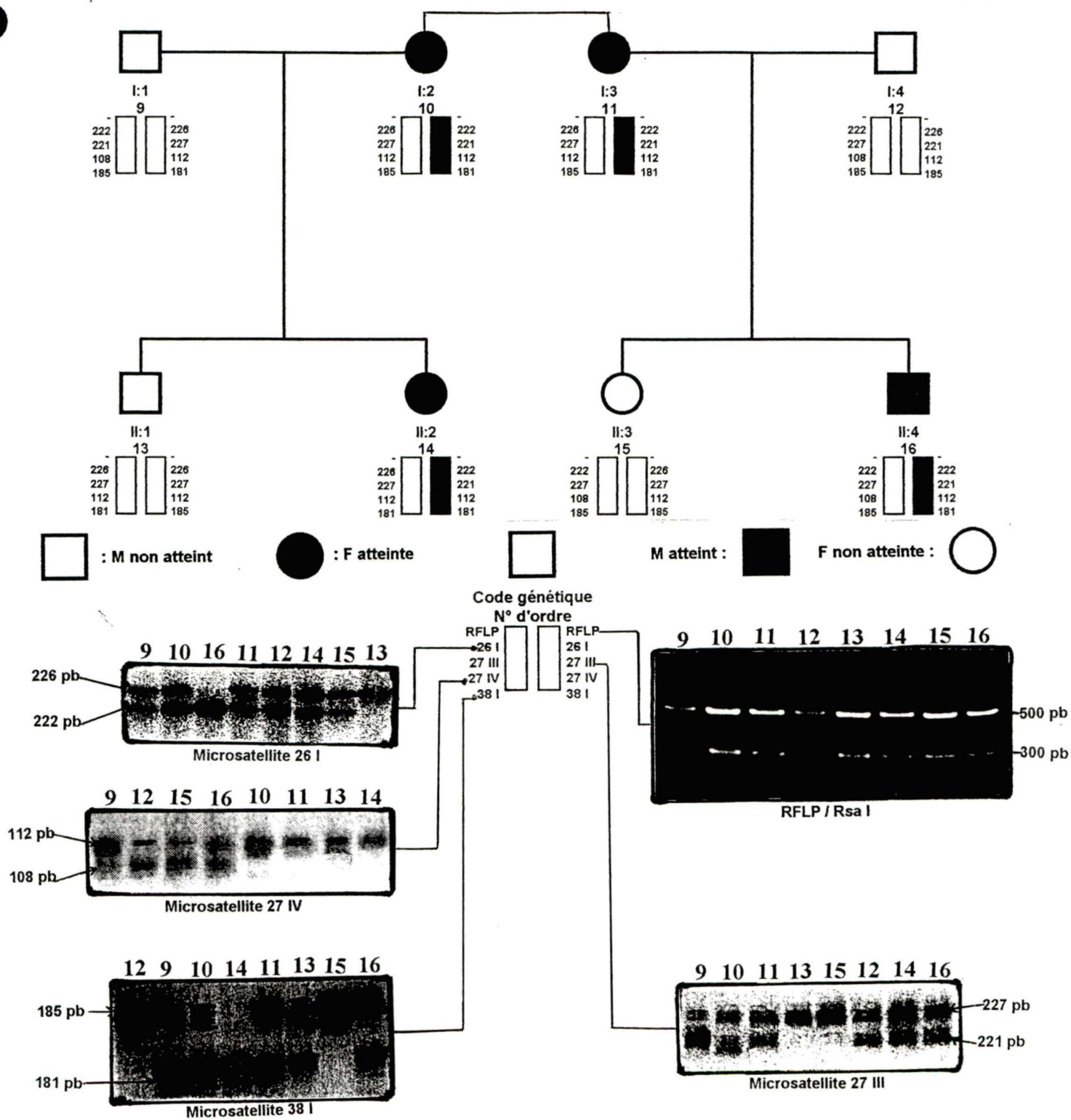


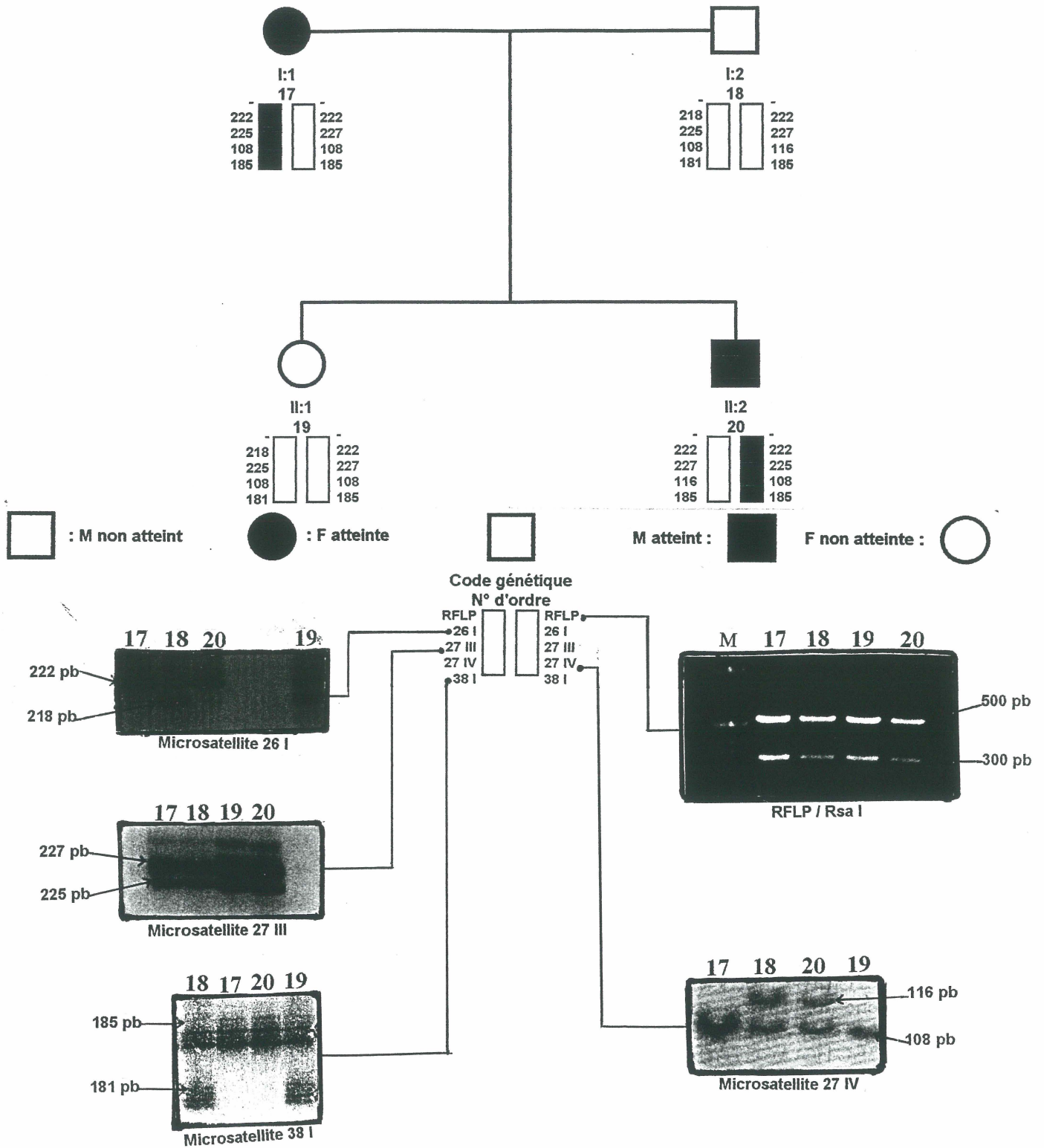
Figure 8 : Haplotype de la famille "C"

On remarque que l'allèle (-, 222, 221, 112, 181) en noir est responsable de la maladie.



# FAMILLE "D"

40



**Figure 9 :** Haplotype de la famille "D"

L'allèle (-, 222, 225, 108, 185) en noir est porteur de la mutation responsable de la NF1.

### **II-1-5-Famille "E"** (Figure 10)

La mère (I:2, 21) est atteinte de la neurofibromatose de type 1, ses allèles (+, 222, 227, 108, 185 / -, 218, 221, 116, 185). Elle a deux filles dont l'une (II:2, 23) est atteinte de la maladie. En analysant les haplotypes, on a remarqué que la mère a donné son allèle sain (+, 222, 227, 108, 185) à sa fille (II:1, 22), qui n'est pas malade. L'autre allèle est donc porteur de la maladie (-, 218, 221, 116, 185) parce qu'elle a donné à sa fille (II:2, 23) qui est atteinte de la neurofibromatose.

Pour cette famille, le diagnostic est fait, l'allèle (-, 218, 221, 116, 185) est porteur de mutations responsable de la maladie.

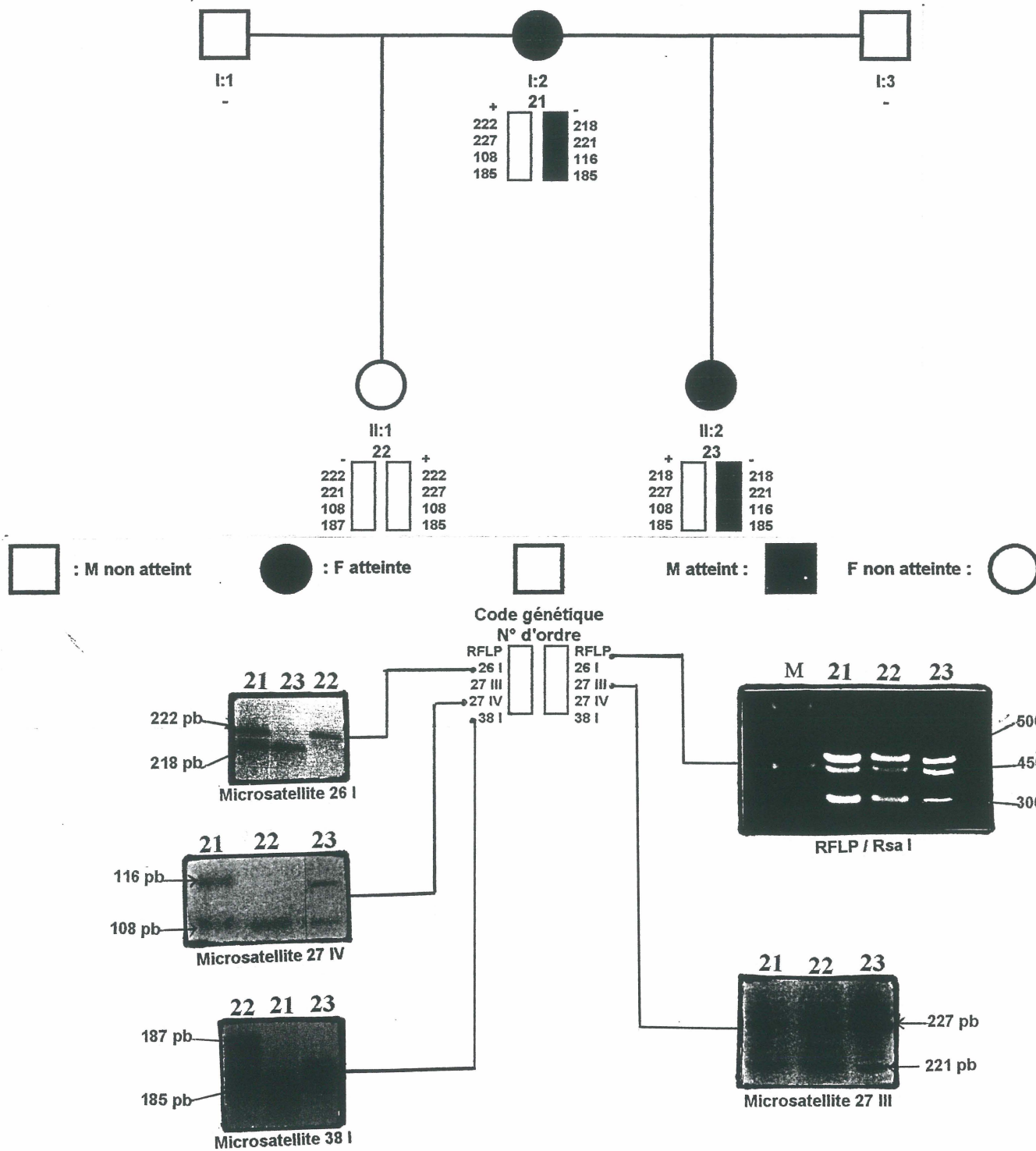
### **II-1-6-Famille "F": un cas sporadique** (Figure 11)

Le père (I:1, 24) est sain et porte les allèles (-, 222, 227, 108, 185 / +, 222, 221, 112, 187); la mère (I:2, 25) aussi n'est pas atteinte de NF1, elle a comme allèle (-, 224, 227, 108, 185 / -, 224, 227, 108, 185). Le fils (II:1, 26) a reçu l'allèle de son père (+, 222, 221, 112, 187) et l'autre de sa mère (-, 224, 227, 108, 185) mais il est atteint de la maladie. Notre marqueur n'arrive donc pas à indiquer l'allèle portant la maladie. Il s'agit donc un cas sporadique et il faut chercher la nature des mutations.

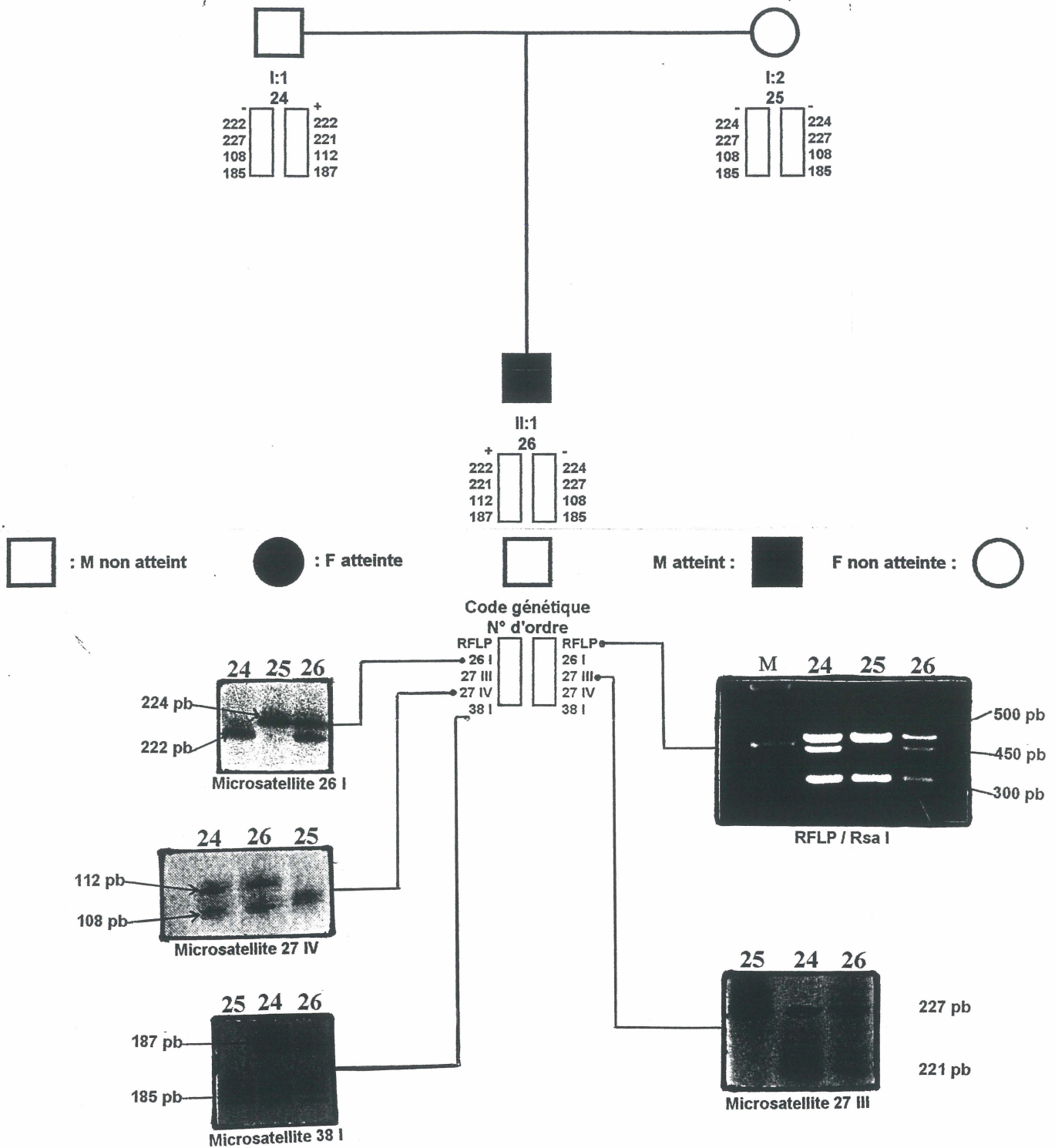
Nous avons insisté d'étudier les haplotypes de cette famille pour essayer de trouver une délétion en cas de perte d'hétérozygotie, malheureusement, il n'y a pas de délétion. La mutation responsable du déclenchement de l'expression de cette maladie est donc une autre nature à déterminer.

# FAMILLE "E"

42



**Figure 10 :** Haplotype de la famille "E"  
 Pour cette famille, l'allèle en noir (-, 218, 221, 116, 185) est responsable de la maladie.



**Figure 11** : Haplotype de la famille "F"

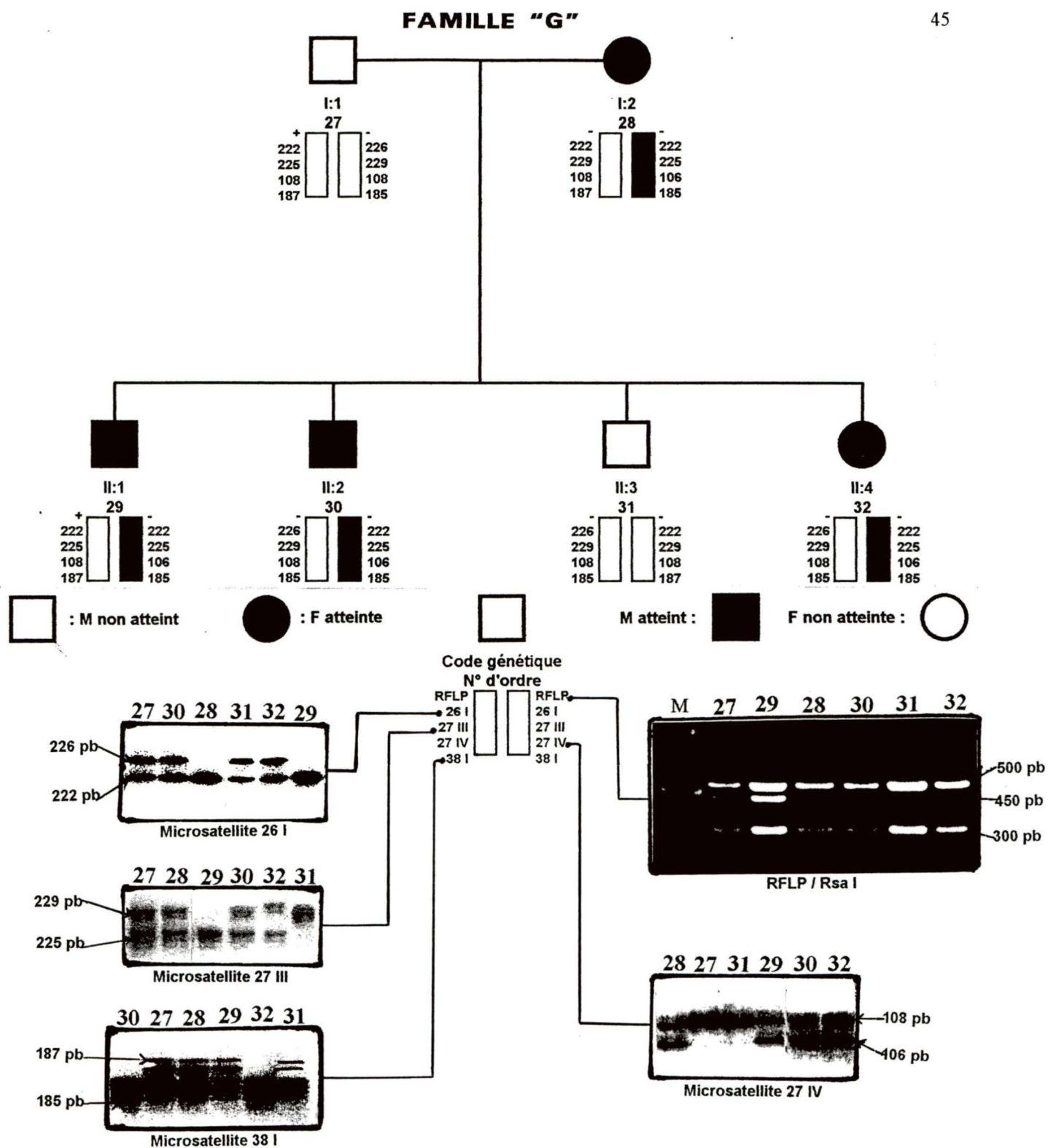
Le garçon (II:1, 26) est un cas sporadique, on n'arrive pas à identifier l'allèle muté. Il n'y a pas de perte d'hétérozygotie, la nature de la mutation n'est pas une grande délétion.

### **II-1-7-Famille "G" (Figure 12)**

Le père (I:1, 27) n'est pas atteint de la maladie et présente les allèles (+, 222, 225, 108, 187 / -, 226, 229, 108, 185) ; la mère (I:2, 28) est atteinte de NF1 et a comme allèles (-, 222, 229, 108, 187 / -, 222, 225, 106, 185). En regardant rapidement les allèles des enfants, on aperçoit que l'allèle (-, 222, 225, 106, 185) porte la maladie et l'allèle (-, 222, 229, 108, 187) de la mère est normal. Ceci est confirmé en analysant les allèles de son fils (II:3, 31). Pour cette famille, l'allèle (-, 222, 225, 106, 185) est porteur de la maladie.

### **II-1-8-Famille "H": la première délétion (Figure 13)**

Le père (I:1, 33) n'est pas atteint de la maladie et il porte les allèles (-, 213, 217, 106, 185 / -, 209, 225, 110, 181), il est homozygote seulement pour le polymorphisme de restriction avec Rsa I (-/-), par contre, il est hétérozygote avec les microsatellites dans l'intron 26 (213/209), dans l'intron 27 III (217/225), dans l'intron 27 IV (106/110) et dans l'intron 38 (185/181). La mère (I:2, 34) est atteinte de la neurofibromatose de type 1 et elle a comme allèle (+, 209, 225, 110, 181). Elle est homozygote ou hémizyote avec tous les marqueurs utilisés. Elle est (+/+) ou (+/0) pour le RFLP ; (209/209) ou (209/0), (225/225) ou (225/0), (110/110) ou (110/0), (181/181) ou (181/0) pour les microsatellites dans les introns 26 I, 27 III, 27 IV et 38 respectivement. L'examen des allèles du fils (II:2, 35) démontre qu'il a hérité l'allèle de son père (-, 213, 217, 106, 185) et l'allèle délété de sa mère. Donc la mère (I:2, 34) et son fils (II:1, 35) sont hémizyote et sont atteints par la maladie. Il y a effectivement perte de l'hétérozygotie avec les marqueurs utilisés et nous avons conclu que c'est une grande délétion à partir de l'exon 5 jusqu'à l'intron 38 et probablement au-delà.



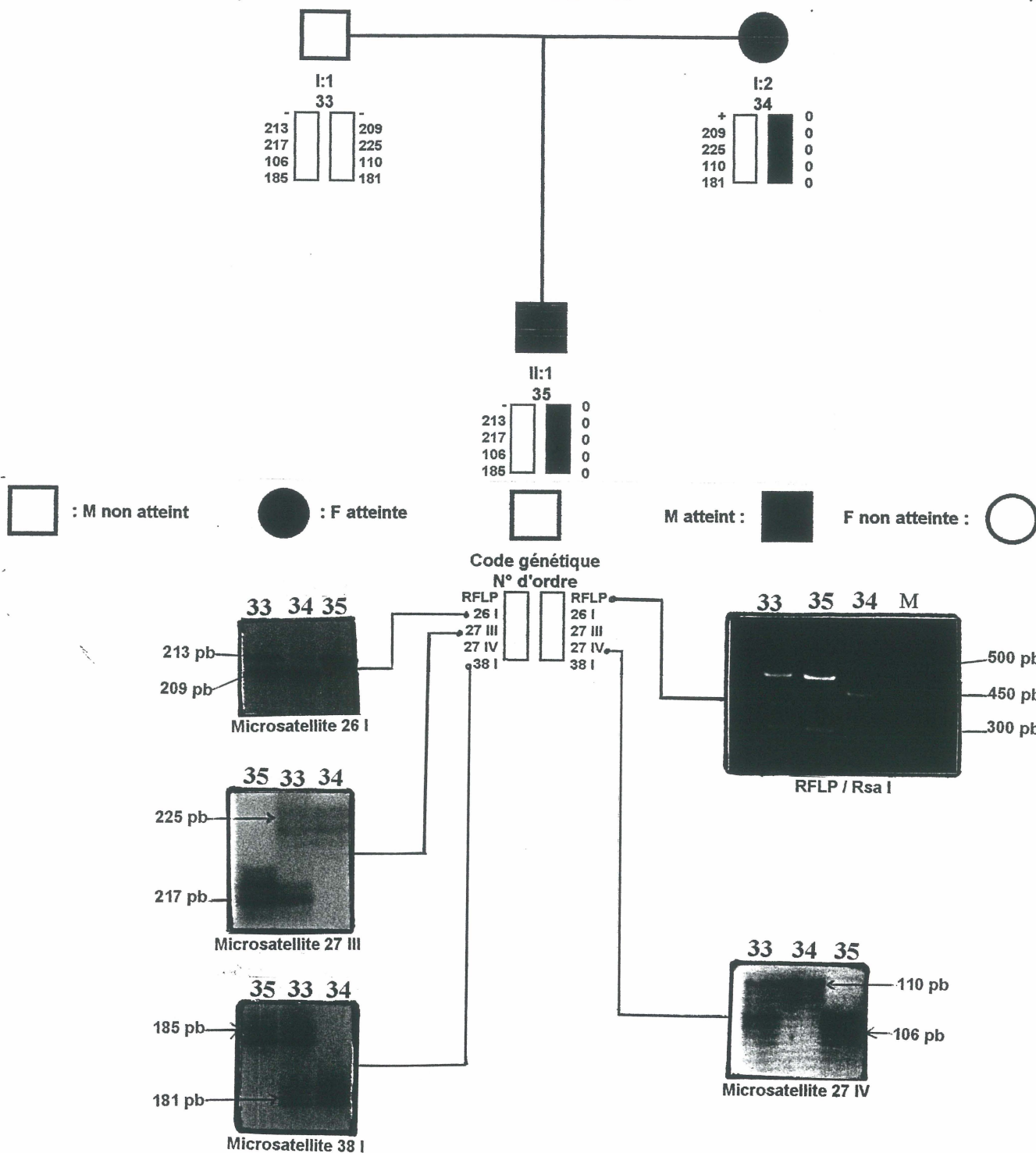
**Figure 12 :** Haplotype de la famille "G"

On remarque que l'allèle en noir (-, 222, 225, 106, 185) est porteur de la mutation responsable de l'expression de la maladie



# FAMILLE "H"

46



**Figure 13 :** Haplotype de la famille "H"

La mère (I:2, 34) et son fils (II:1, 35) sont hémizygotes, l'allèle délété est (0, 0, 0, 0, 0). Il y a une perte de l'hétérozygotie, la délétion commence à l'exon 5 et se termine à l'intron 38.

### **II-1-9-Famille "I"** (Figure 14)

La figure 14 montre une famille composée de quatre individus dont trois sont atteints de la neurofibromatose de type 1. La mère (I:2, 37) est atteinte de maladie, porte les allèles (-, 211, 219, 110, 187 / -, 211, 219, 110, 185) ; le père est sain et a comme allèles (-, 211, 219, 110, 187 / -, 211, 215, 106, 185). Ils ont deux garçons qui sont atteints de la neurofibromatose de type 1. Les deux garçons ont les mêmes allèles (-, 211, 215, 106, 185 / -, 211, 219, 110, 185), nous avons remarqué qu'ils ont hérité l'allèle malade (-, 211, 219, 110, 185) provenant de leur mère.

Pour cette famille, l'héritage de l'allèle (-, 211, 219, 108, 185) signifie la présence de la maladie parce qu'on le retrouve chez les patients (I:2, 37; II:1, 38 et II:2, 39).

### **II-1-10-Famille "J"** (Figure 15)

La figure 15 montre l'arbre généalogique d'une famille sur trois générations. Le grand-père (I:1, 40) est atteint de la neurofibromatose et a comme allèles (-, 213, 219, 106, 185 / +, 213, 219, 108, 181). En regardant les allèles du père (II:1, 42) qui est atteint de la maladie, porte les allèles (-, 213, 219, 106, 185 / -, 217, 219, 108, 185), nous avons remarqué que l'allèle (-, 213, 219, 106, 185) est responsable de la maladie. Cette affirmation est vérifiée parce que le fils (III:1, 44) a comme allèles (-, 213, 219, 106, 185 / -, 217, 219, 106, 181), nous avons remarqué qu'il a hérité le même allèle (-, 213, 219, 106, 185) porteur de la mutation et qui est malade.

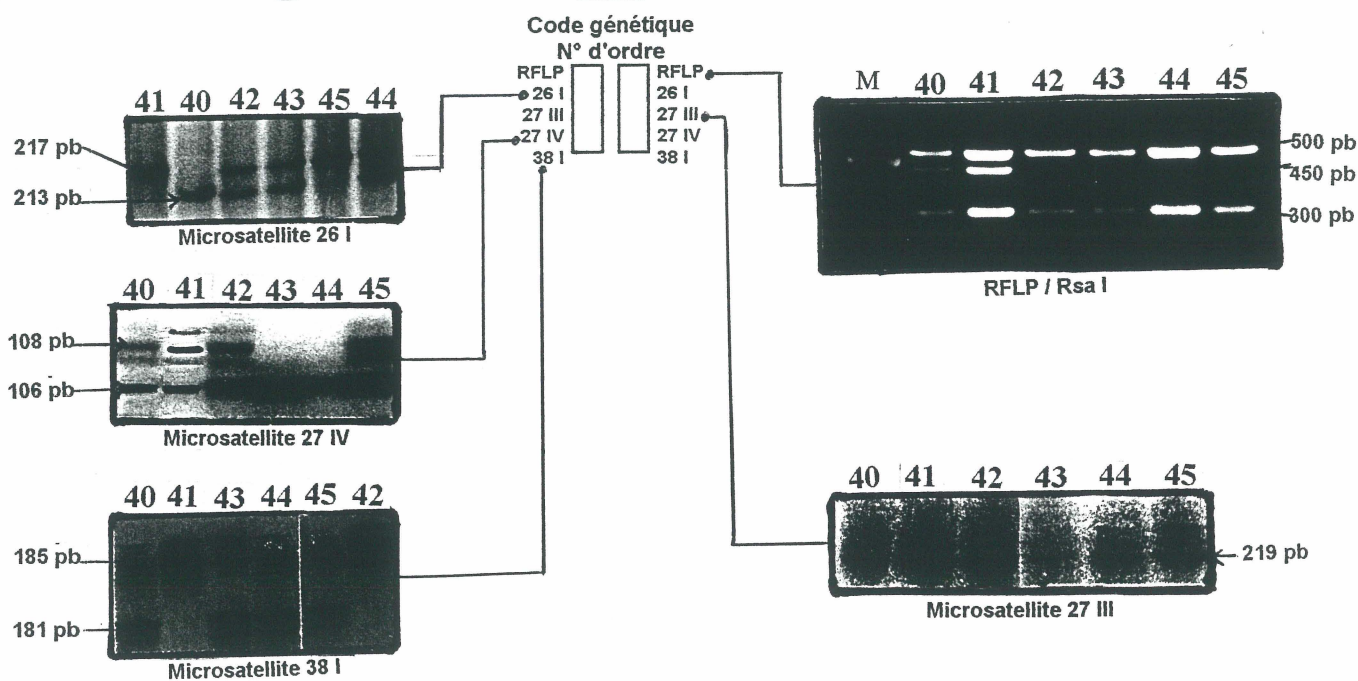
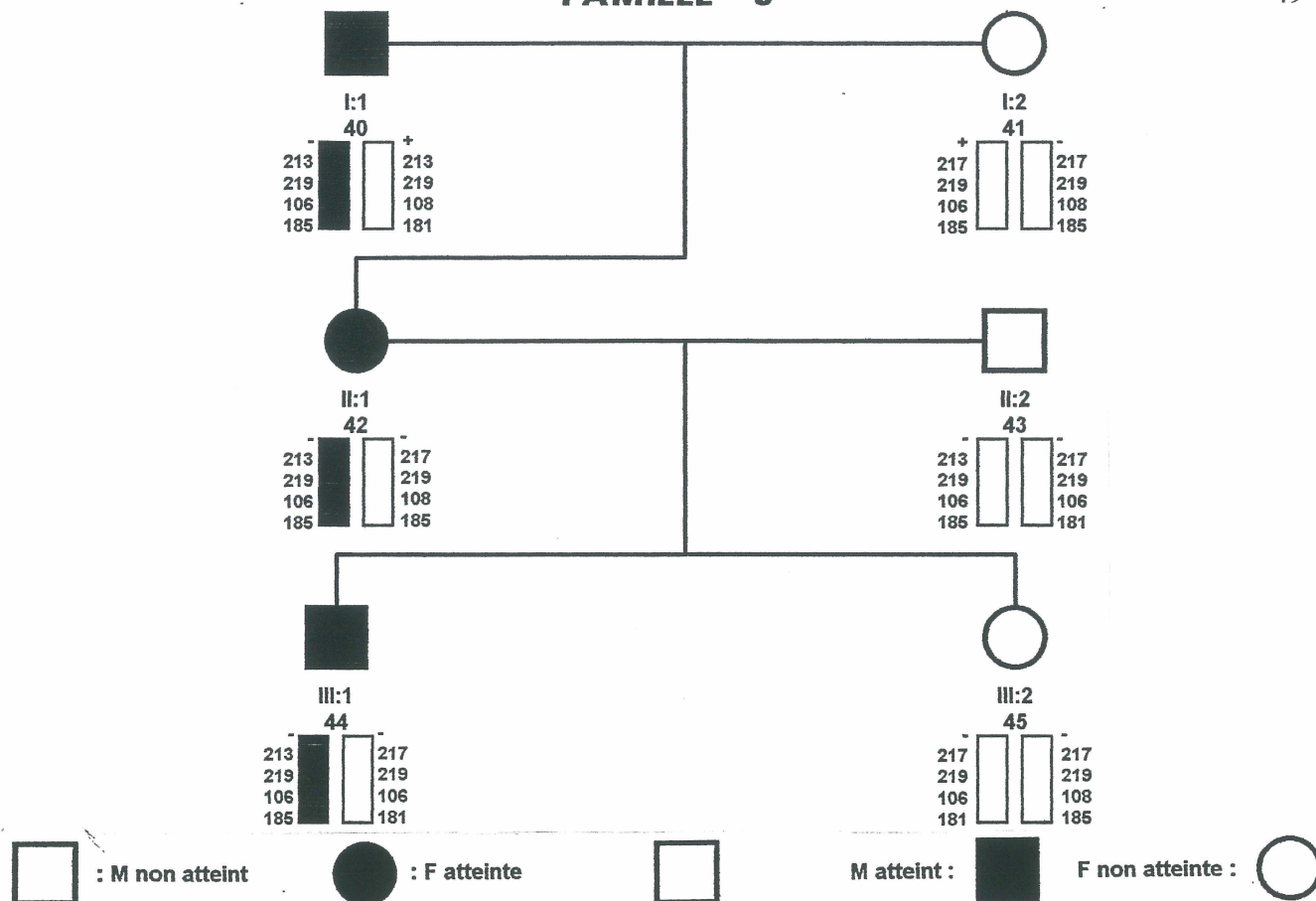
La conclusion tirée pour cette famille, l'allèle (-, 213, 219, 106, 185) est porteur de la mutation responsable de la maladie.





# FAMILLE "J"

49



**Figure 15:** Haplotype de la famille "J"

On remarque que l'allèle (-, 213, 219, 106, 185) est responsable de la maladie sur cette famille

### **II-1-11-Famille "K"** (Figure 16)

La figure 16 montre un arbre généalogique d'une famille à trois générations et composée de dix individus dont cinq sont atteints de la maladie. Le grand-père (I:1, 46) est atteint de la neurofibromatose et porte les allèles (-, 208, 217, 108, 185 / -, 206, 217, 116, 185). On constate que l'allèle (-, 206, 217, 116, 185) est porteur de la maladie puisqu'il se retrouve chez le grand-père (I:1, 46), les deux mères (II:2, 49 et II:3, 50) et les enfants (III:2, 53 et III:3, 54). Pour cette famille, le chromosome porteur de la mutation responsable de la neurofibromatose de type 1 est (-, 206, 217, 116, 185).

### **II-1-12-Famille "L": la deuxième délétion** (Figure 17)

C'est la combinaison (0, 210, 215, 108, 187) qui définit le chromosome porteur de la mutation. Lorsque le RFLP pour les individus a été déterminé, on constate que le père (II:2, 59) était hétérozygote (+/-) et que la mère (II:1, 58) était homozygote (-/-) ou hémizygote (-/0), alors que les deux filles (III:1, 60 et III:2, 61) étaient, contre toute attente, homozygotes (+/+) ou hémizygotes (+/0). Les deux filles auraient dû avoir un allèle (-) en provenance de leur mère si cette dernière était homozygote (-/-). Comme la figure nous montre que ce n'est pas le cas, la seule possibilité est que l'on est en présence d'une délétion chez la mère (II:1, 58) qui couvre l'exon 5 et qui s'arrête quelque part avant ou dans l'intron 26 puisqu'on observe les hétérozygoties des autres marqueurs génétiques à partir de l'intron 26 chez la mère (II:2, 58) et les filles (III:1, 60 et III:2, 61).

Les résultats sont très intéressants car on a pu identifier une délétion. L'origine de la mutation est du côté du grand-père, l'allèle (-, 210, 215, 108, 187) a subi cette délétion.

## FAMILLE "K"

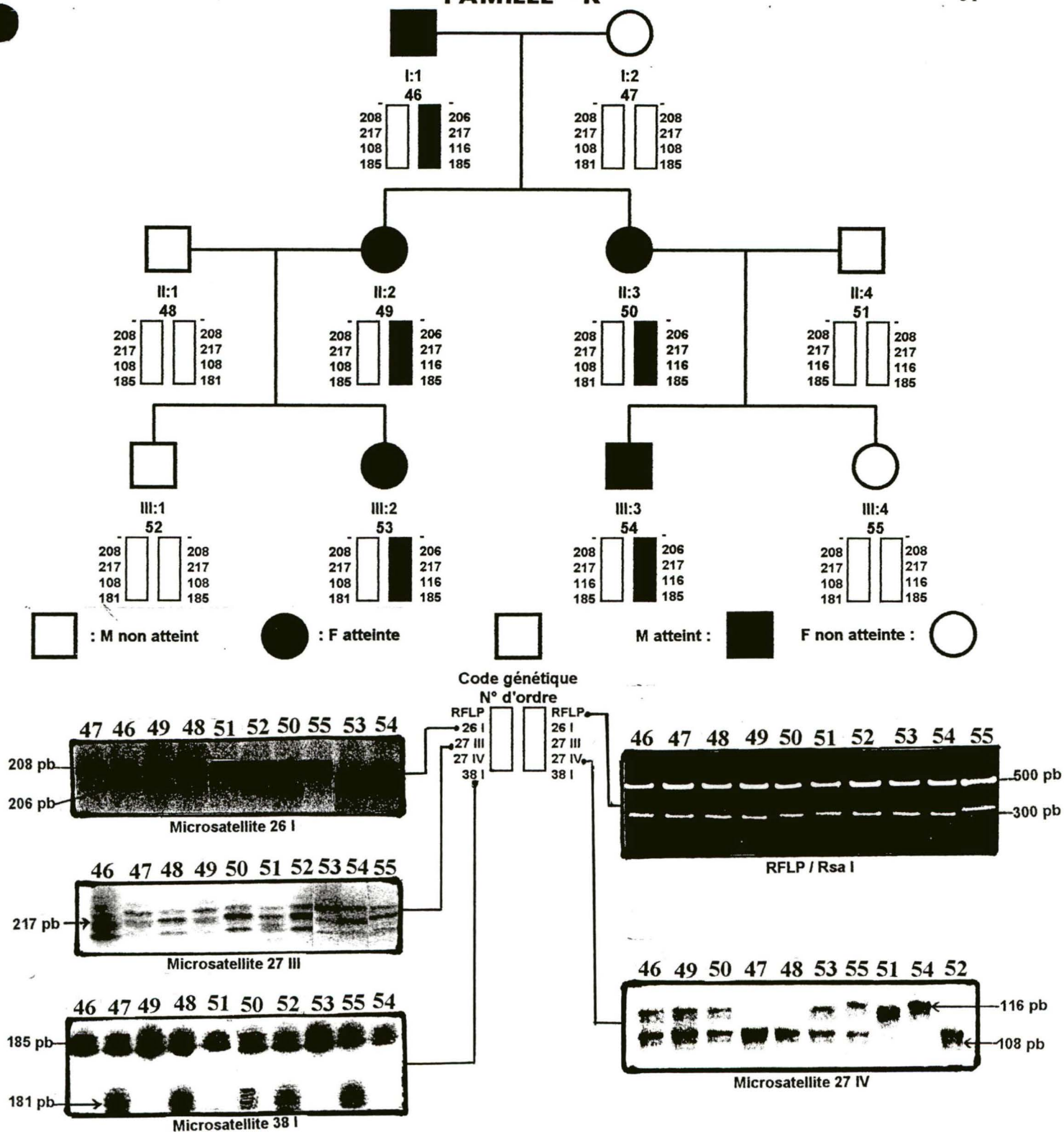


Figure 16 : Haplotype de la famille "K"

L'allèle en noir (-, 206, 217, 116, 185) est porteur de la mutation responsable de la maladie.



## FAMILLE "L"

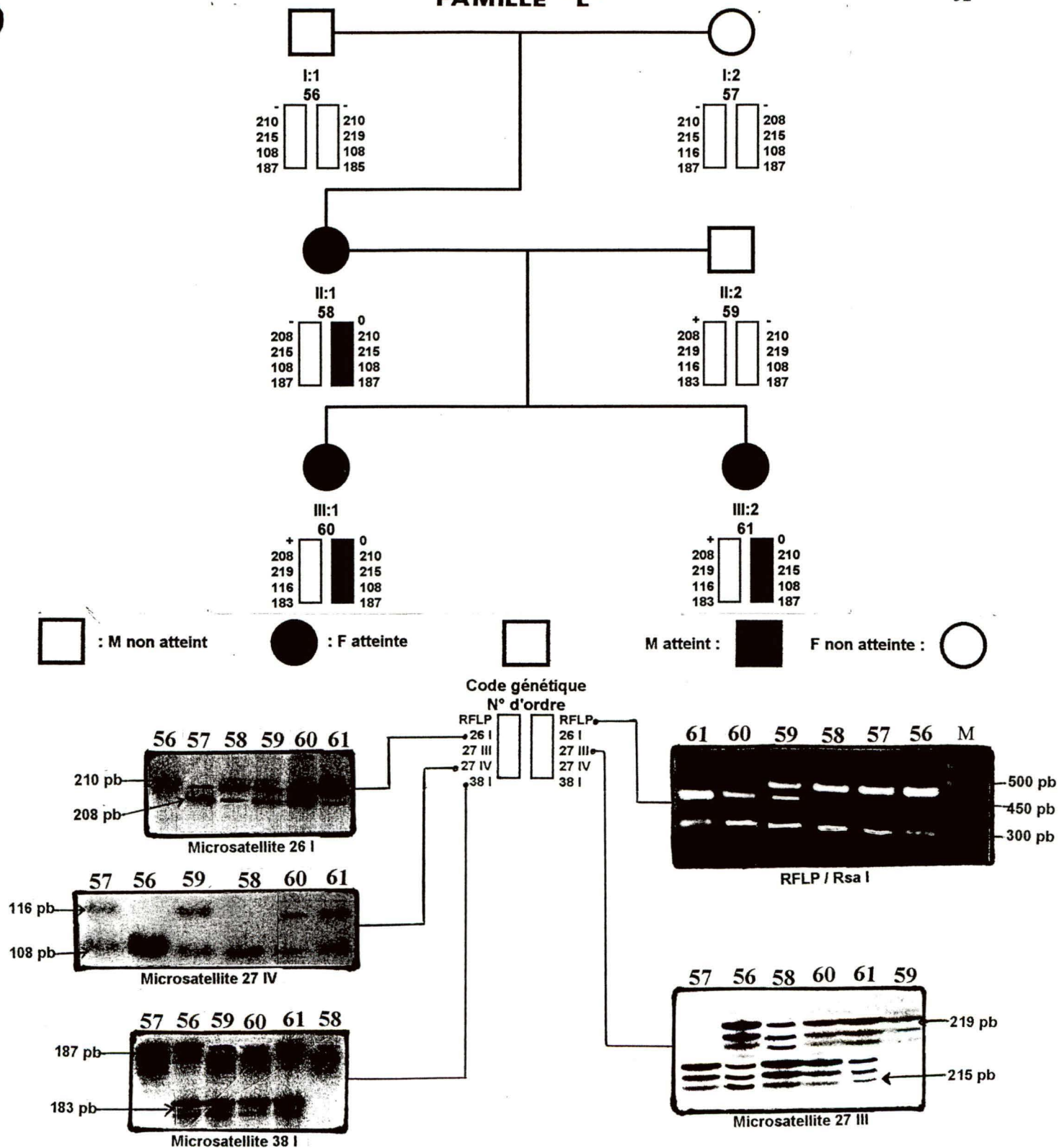


Figure 17 : Haplotype de la famille "L"

Les deux filles (III:1, 60 et III:2, 61) et la mère (II:1, 58) sont hémizygotes (+/0). Il y a une perte d'hétérozygotie, la délétion commence à l'exon 5 et se termine à l'intron 26.

### **II-1-13-Famille "M": un cas asymptomatique (Figure 18)**

La figure 18 montre l'arbre généalogique d'une famille sur deux générations. Les résultats démontrent que c'est l'allèle (-, 206, 217, 104, 185) qui définit le mieux le chromosome porteur de la mutation. La fille (II:1, 64) et le garçon (II:2, 65) ont les mêmes allèles (-, 206, 217, 104, 185 / -, 206, 217, 108, 181), ils sont homozygotes pour le RFLP (-/-), pour les microsatellites 26 I (206/206) et 27 III (217/217). La fille est atteinte de la neurofibromatose alors que le garçon ne présente aucun signe clinique de la maladie, il est âgé de 15 ans au moment de l'investigation.

L'allèle (-, 206, 217, 104, 185) est porteur de la mutation causale de la maladie et le garçon (II:2, 65) est un cas asymptomatique.

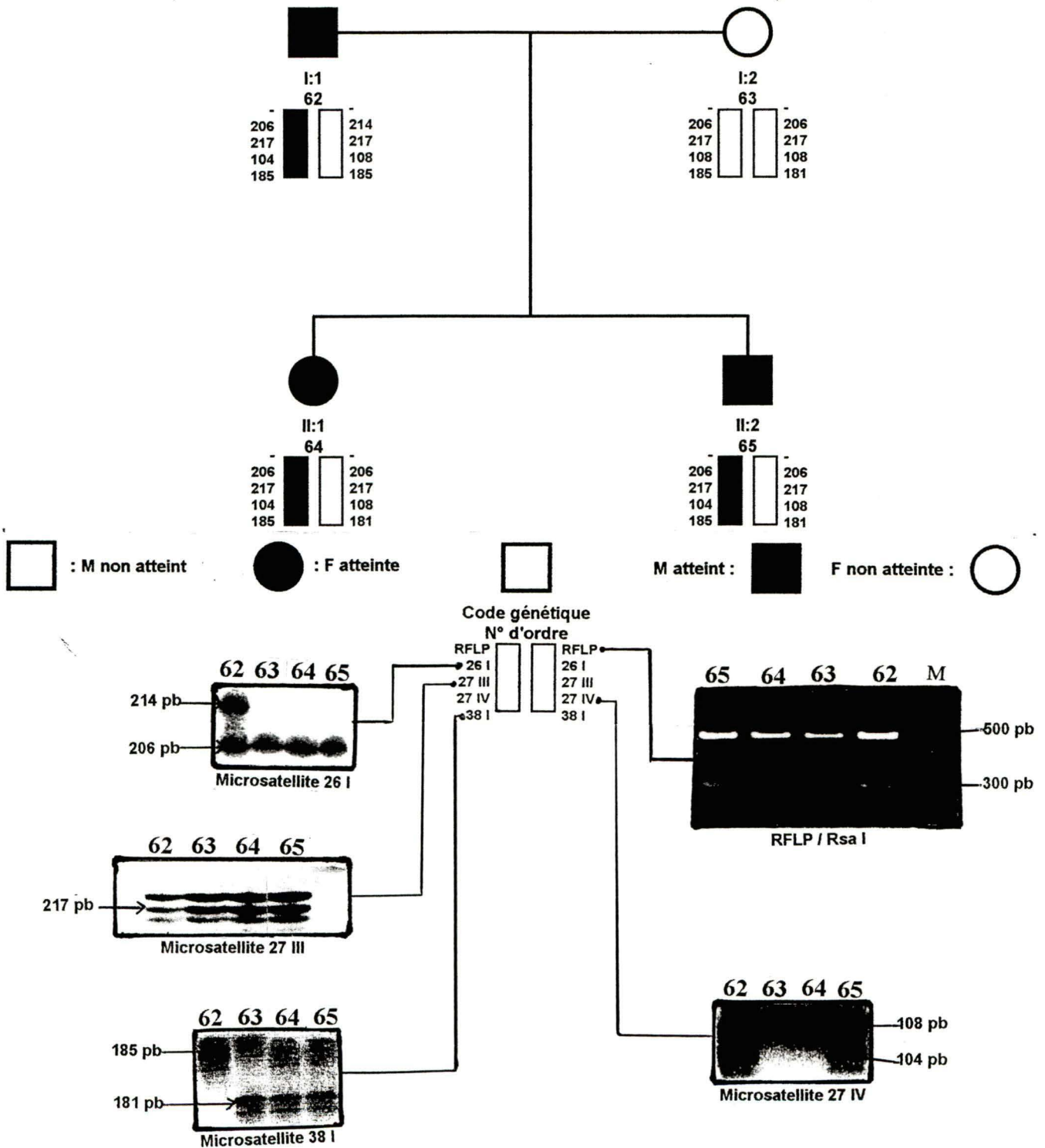
### **II-1-14-Famille "N" (Figure 19)**

La figure 19 montre une famille composée de trois individus. Le père (I:1, 66) est atteint de la maladie et porte les allèles (-, 210, 217, 110, 183 / -, 214, 221, 110, 187). En analysant les haplotypes, on découvre que l'allèle (-, 210, 217, 110, 183) qui définit le chromosome porteur de la mutation responsable de la maladie puisqu'il est commun aux deux personnes atteintes de NF1 soit le père (I:2, 66) et la fille (II:1, 68). Dans le cas de la fille, on observe qu'elle est hétérozygote seulement pour le microsatellite 27 III (221/227) alors qu'elle est homozygote pour le RFLP (-/-), pour les microsatellites 27 IV (110/110) et 38 I (183/183).

Pour cette famille, l'allèle (-, 210, 217, 110, 183) est porteur de la mutation parce que le père (I:1, 66) et sa fille (II:1, 68) sont atteints de la neurofibromatose de type 1.

# FAMILLE "M"

54

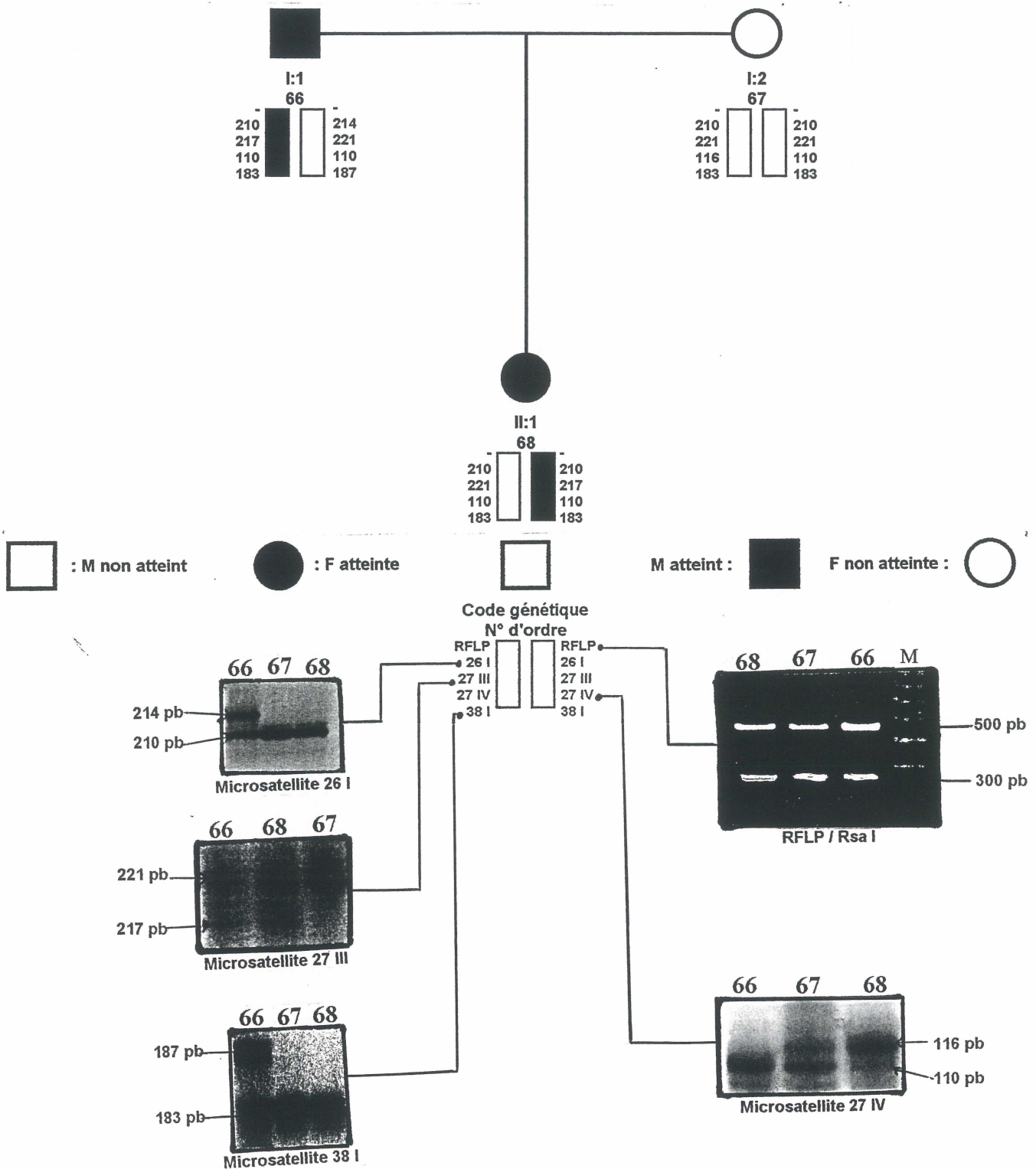


**Figure 18:** Haplotype de la famille "M"

L'allèle en noir (-, 206, 217, 104, 185) est porteur de la mutation responsable de la maladie mais le garçon (II:1, 64) n'est pas malade, c'est un cas asymptomatique.

# FAMILLE "N"

55



**Figure 19 :** Haplotype de la famille "N"

Pour cette famille, l'allèle en noir (-, 210, 217, 110, 183) est responsable de la maladie.



### **II-1-15-Famille "O"** (Figure 20)

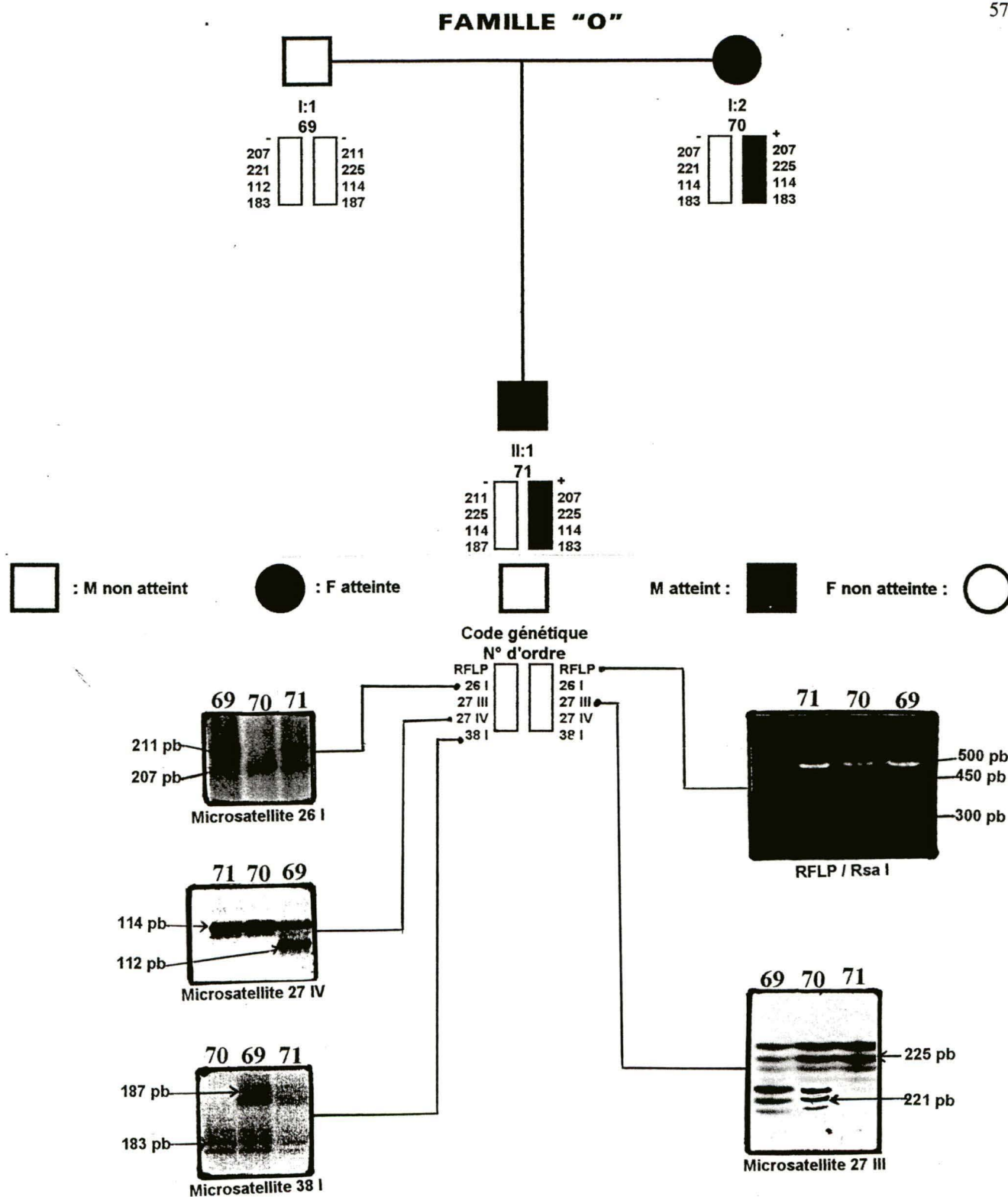
La figure 20 montre un arbre généalogique d'une famille composée de trois individus. La mère (I:2, 70) est atteinte de maladie et porte les allèles (-, 207, 221, 114, 183 / +, 207, 225, 114, 183). Le fils (II:1, 77) est atteint de maladie et a comme allèles (+, 207, 225, 114, 183 / -, 211, 225, 114, 183). Nous avons remarqué que l'allèle (+, 207, 225, 114, 183) est porteur de la mutation responsable de la neurofibromatose.

Pour cette famille, l'allèle (+, 207, 225, 114, 181) est porteur de la mutation parce qu'on retrouve cet allèle chez la mère (I:2, 70) et le fils (II:1, 71) qui sont malades.

### **II-1-16-Famille "P"** (Figure 21)

La mère (I:2, 73) est atteinte de la maladie et porte les haplotypes (-, 214, 215, 114, 181 / -, 218, 215, 114, 181), elle est hétérozygote seulement pour le microsatellite 26 I (214/218). Le fils (II:1, 74) est atteint de la neurofibromatose de type 1 parce qu'il a reçu l'allèle malade (-, 214, 215, 114, 181) provenant de sa mère, il est hétérozygote à tous les marqueurs génétiques à notre disposition, (+/-) avec le RFLP/Rsa I, (218/214) avec le marqueur 26 I, (219/215) avec le microsatellite 27 III, (108/114) avec 27 IV et (185/181) avec le microsatellite 38I. En analysant les haplotypes, on découvre que l'allèle (-, 214, 215, 114, 181) est porteur de la mutation

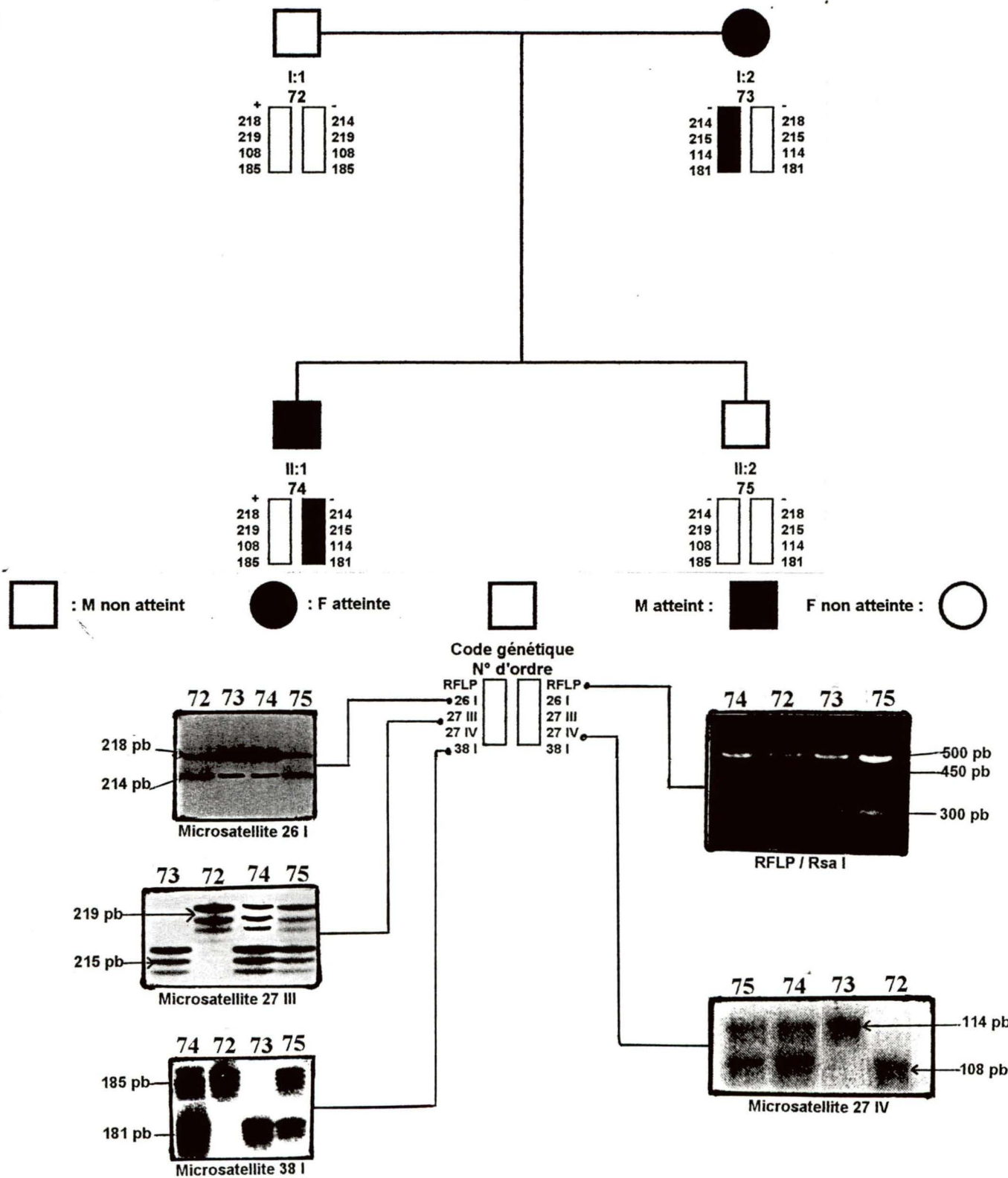
Pour cette famille, l'allèle muté responsable de la manifestation clinique de la NF1 est (-, 214, 215, 114, 181) puisqu'on identifie cet allèle chez la mère (I:2, 73) et le fils (II:1, 74).



**Figure 20:** Haplotype de la famille "O"  
 L'allèle en noir (+, 207, 225, 114, 183) est porteur de la mutation responsable de la maladie.

# FAMILLE "P"

58



**Figure 21 :** Haplotype de la famille "P"

L'allèle muté (-, 214, 215, 114, 181) est responsable de la manifestation de la NF1.

## **II-2-Analyse de l'informativité des marqueurs utilisés dans le haplotypes.**

Nous avons analysé les haplotypes de 16 familles comprenant 75 individus dont 43 atteints de la neurofibromatose et 32 sujets sains membre de la famille. Le taux d'hétérozygotie est un élément déterminant pour les marqueurs utilisés dans les études de haplotypes, nous avons remarqué que les taux d'hétérozygotie pour les microsatellites sont nettement supérieurs par rapport au RFLP/Rsa I. Les microsatellites sont donc plus informatifs que le RFLP. Ensuite, les microsatellites avec la répétition (CA)<sub>n</sub> sont encore plus informatifs que les autres combinaisons puisque le taux d'hétérozygotie du microsatellite dans l'intron 26 I (TAGA)<sub>n</sub> est inférieur par rapport aux microsatellites (CA)<sub>n</sub> dans les introns 27 III, 27 IV et 38 I. Enfin, la comparaison des taux d'hétérozygotie entre malades et sujets sains a été calculée avec tous les marqueurs et il n'y a pas de différence significative (Tableau 4).

Nous avons essayé de prouver que le site Rsa I au niveau de l'exon 5 est un simple polymorphisme. Effectivement, il n'y a pas de relation entre présence ou absence du site de restriction Rsa I et la présence ou absence de la maladie en utilisant le test de Fischer parce que la valeur du  $p=0.205$ , supérieur à 0.05 comme seuil de relation acceptable (Tableau 5).

Le tableau 6 montre les caractéristiques des microsatellites utilisés, nous avons remarqué une certaine différence entre les longueurs de microsatellites synthétisés par PCR chez les sujets atteints de la maladie et les sujets sains. Effectivement, il n'y a pas de différence statistiquement valable parce que les valeurs de  $p$  par le test de Student non pairé sont supérieures à 0.05. On reviendra plus tard les explications au chapitre de commentaires et discussions.

Marqueurs	Sujets malades n (%)	Sujets sains n (%)	Total des sujets n (%)
<b>RFLP/Rsa I</b>	5 (11.62)	10 (31.25)	15 (20.00)
<b>26I</b>	25 (58.13)	13 (40.62)	38 (50.66)
<b>27III</b>	24 (55.81)	19 (59.37)	43 (57.33)
<b>27IV</b>	29 (67.44)	18 (56.25)	47 (62.66)
<b>38I</b>	26 (60.46)	24 (75.00)	50 (66.66)

**Tableau 4** : Taux d'hétérozygotie des marqueurs génétiques.

Les taux d'hétérozygotie pour les microsatellites sont nettement supérieurs au RFLP. Il n'y a pas de différence du point de vue statistique entre les taux d'hétérozygotie des patients et les sujets sains avec les différents marqueurs (valeurs des  $p > 0.05$ ).

		Maladie	
		Présence	Absence
Site de restriction	Présence (+)	3	17
	Absence (-)	37	93

**Tableau 5** : Relation entre maladie et le site de restriction.

Selon notre expérience, il n'y a pas de relation entre présence ou absence du site de restriction Rsa I et la neurofibromatose de type 1 ( $p = 0.205$ , supérieur à 0.05). Ce résultat confirme que le site de restriction Rsa I est un simple polymorphisme au sein de la population.

Marqueurs	Indice	Sujets sains	Sujets malades	Total des sujets	Valeur du p
<b>26I</b>	Moyenne	216.34	204.68	211.92	0.098 ns
	Ecart-type	6.98	45.69	25.79	
	Mode	210	222	210	
<b>27III</b>	Moyenne	221.73	211.00	218.58	0.136 ns
	Ecart-type	5.43	46.76	25.99	
	Mode	227	225	227	
<b>27IV</b>	Moyenne	109.81	106.09	108.72	0.307 ns
	Ecart-type	3.59	23.80	13.24	
	Mode	108	116	108	
<b>38I</b>	Moyenne	185.58	175.90	182.02	0.146 ns
	Ecartype	1.73	38.81	21.31	
	Mode	185	185	185	

**Tableau 6** : Relation entre la maladie et la longueur des microsatellites.

Il y a une certaine différence entre les longueurs de microsatellites synthétisés par PCR chez les sujets atteints de la neurofibromatose et les sujets sains membres de la famille. Mais du point de vue statistique, en utilisant le test de Student, il n'y a pas de différence valable parce que les valeurs de p sont supérieures au seuil acceptable ( $p > 0.05$ ).

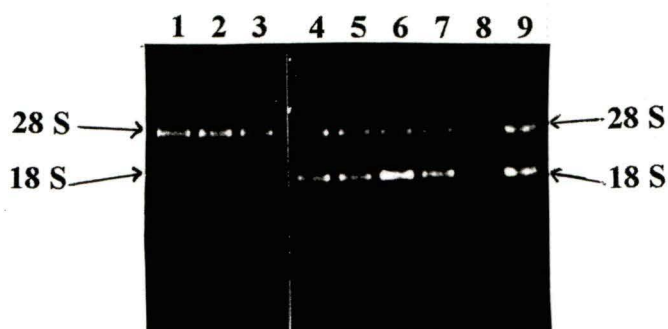


### **III-Le diagnostic moléculaire direct: Recherche des mutations.**

Nous avons étudié dans une première étape les haplotypes des seize familles atteintes de la neurofibromatose de type 1 et nous avons trouvé deux délétions. En même temps, nous avons caractériser les mutations chez huit individus atteints de la maladie de façon sporadique et chez un individu non atteint de NF1 comme contrôle. Pour des raisons pratiques, nous avons numéroté de 1 à 8 les patients et 9 le contrôle. Ces individus sont référés respectivement Rou 44, Rou 262, Rou 1039, Rou 1149, Rou 5002, Rou 5313, Rou 5512, Rou 5882 et Rou 6462. Nous avons utilisé trois approches pour caractériser une mutation en faisant appel, soit aux techniques électrophorétiques, soit au polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (SSCP), soit au séquençage direct des produits de PCR. Dans ces trois cas, la détection s'est faite à partir de l'ADNc obtenus des ARNs du gène NF1 de chaque mutant et le témoin.

La taille du gène NF1 étant de 350 kb environ, il est impossible d'essayer de trouver une mutation sur ce grand gène. Par contre, les cellules lymphoblastoïdes synthétisent toujours les ARNm de NF1, il est beaucoup plus simple de rechercher des mutations dans la région codante du gène, c'est à dire dans l'ADNc.

Les ARNm des lignées lymphoblastoïdes des huit patients NF1 sporadiques et un individu témoin ont été extraits en présence de Trizol comme décrit dans le matériel et méthodes. À partir de  $3 \times 10^6$  cellules, on obtient 10 à 15  $\mu$ g d'ARN. La qualité des ARNs a été testée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en présence de tampon TBE. La présence des deux ARNs ribosomiaux 18S et 28S non dégradés suggère fortement que les ARNm eux non plus ne soient pas dégradés (Figure 22).



**Figure 22 :** Qualité des ARNs extraits

Les ARNs sont extraits selon la méthode de Trizol chez huit patients atteints de NF1 sporadique (pistes 1 à 8) et un témoin contrôle (piste 9). Ces individus sont référés respectivement Rou 44, Rou 262, Rou 1039, Rou 1149, Rou 5002, Rou 5313, Rou 5512, Rou 5882 et Rou 6462. La présence de deux bandes correspond aux ARNs ribosomiaux 28S et 18S non dégradés suggère fortement que les ARNm eux ne soient pas dégradés.



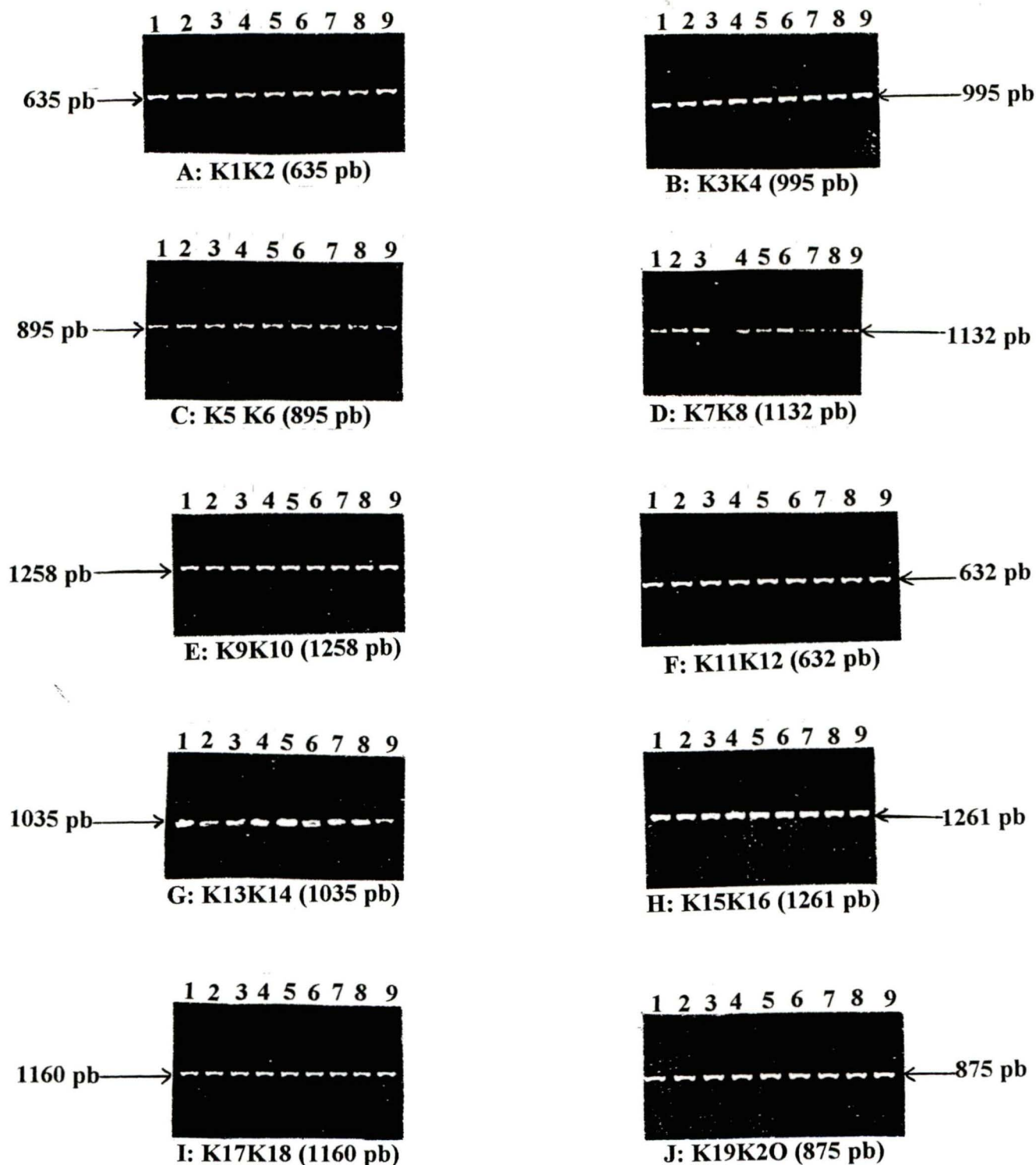
### **III-1-Recherche de mutations par migration électrophorétique.**

La synthèse de l'ADNc NF1 permet de rechercher la présence de délétion ou d'insertion parmi les huit mutants. Chaque ADNc a été divisé en dix régions, chacune de ces régions a été amplifiée par PCR comme décrit dans matériel et méthodes avec dix paires d'oligonucléotides K1K2, K3K4, K5K6, K7K7, K9K10, K11K12, K13K14, K15K16, K17K18, K19K20.

Ces régions une fois amplifiées ont été étudiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% pour détecter les grandes délétions ou insertions et sur gels polyacrylamides 5% non dénaturant pour identifier les petites délétions ou insertions. Une bande migrant plus ou moins vite par rapport à la bande normale serait l'indication d'une délétion ou insertion.

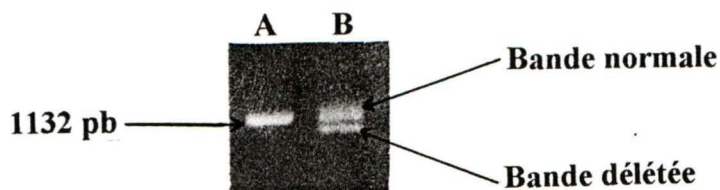
La figure 23 montre les résultats obtenus avec huit ADNc des patients (pistes 1 à 8) et un ADNc comme témoin (piste 9) amplifiés par RT-PCR. Nous avons remarqué qu'il n'y a pas de différence de taille sur les fragments amplifiés sur gel d'agarose 1%.

Par contre sur gel polyacrylamide 5%, nous avons remarqué la présence d'une bande additionnelle qui migre plus vite que le fragment normal et dont la quantité est moins importante que la bande normale (Figure 24-A) chez le patient n°2 (Rou 262) avec le produit amplifié par K7K8, nous avons pensé que c'est une délétion. Les deux bandes fut électroéluées et séquencées directement, les séquences ont montré une délétion de 13 pb dans l'exon 28 (Figure 24-B). La délétion commence au nucléotide 5097 jusqu'au 5109. Suite à cette délétion, il y a un décalage du cadre de lecture (frameshift mutation) de l'ARNm délété et formation d'un codon stop (TAG) en position 1725 qui signale l'arrêt de traduction et entraîne la constitution d'une neurofibromine tronquée sur l'allèle délété (Figure 24-C).



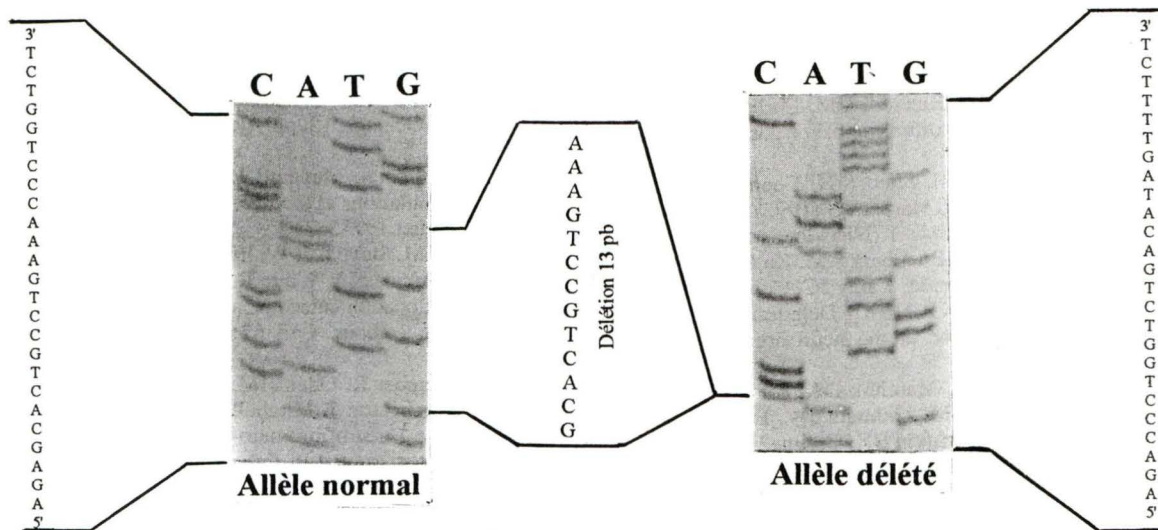
**Figure 23:** Amplification par PCR de l'ADNc du gène NF1

Analyse moléculaire par électrophorèse en gel d'agarose 1% des produits d'amplification par RT-PCR du gène NF1 chez huit individus atteints de neurofibromatose (pistes 1 à 8) et un sujet normal comme témoin (piste 9).



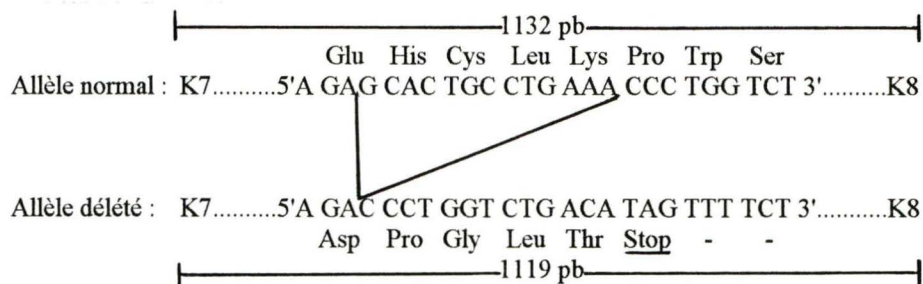
**Figure 24-A :** Deux bandes sur gel polyacrylamide 5%

Le couple K7K8 synthétise normalement un fragment de 1132 pb (piste A). Chez le patient n°2 (Rou 262), on a remarqué la présence d'une bande supplémentaire qui migre plus vite que le fragment normal (piste B). C'est une délétion. Notons que la bande délétée est moins intense.



**Figure 24-B :** Séquences des deux bandes

Les deux bandes ont été électroéluées et séquencées. Les deux séquences montrent une délétion de 13 pb. La délétion commence au nucléotide 5097 jusqu'au 5109 dans l'exon 28 de l'ADNc du gène NF1 chez le patient n°2 (Rou 262).



**Figure 24-C :** Conséquence moléculaire de la délétion

La mutation 5097 (délétion 13 pb) entraîne un décalage du cadre de lecture (ex : l'acide glutamique GAG en position 1720 devient acide aspartique GAC). Ensuite il y a formation du codon stop (TAG) en position 1725 sur l'allèle délété qui signale un arrêt de traduction et constitution d'une neurofibromine tronquée.

**Figure 24 :** La délétion 13 pb dans l'exon 28

### **III-2-Le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin**

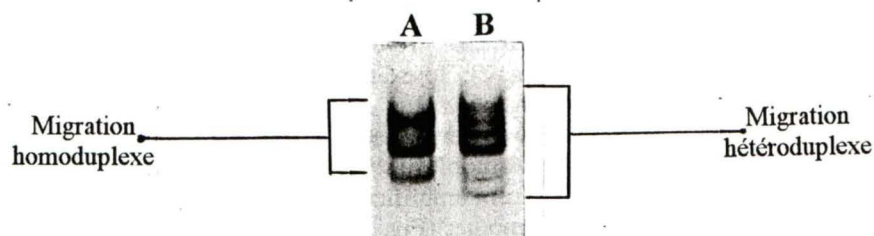
La structure secondaire que prend un segment d'ADN simple brin est fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle au sein de cette séquence modifie en général suffisamment la structure secondaire pour qu'il en résulte une modification de la migration en électrophorèse, c'est la technique de polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin ou SSCP.

Les produits de RT-PCR des 8 individus atteints de neurofibromatose de type 1 et un individu témoin avec les 10 couples d'amorces recouvrant la partie codante du gène NF1 ont été analysés par la méthode de SSCP. Au cours de cette expérience, nous avons remarqué un profil de migration de type hétéroduplexe (6 bandes différentes) chez le patient n°5 (Rou 5002) avec le couple d'amorce K17K18 (Figure 25-A). Notons que le couple d'oligonucléotide K17K18 synthétise un fragment de 1160 pb de l'ADNc du gène NF1

Nous avons réamplifié ce fragment avec le même couple d'amorces pour avoir une quantité convenable pour le séquençage et nous avons séquençé l'ADN. Au cours de la lecture du gel, nous avons remarqué qu'à partir de la bande T en position 6538, il y a toujours deux résidus de séquences se retrouvent aux mêmes niveaux. Il s'agit d'une délétion de T en position 6538 dans l'exon 34 qui engendre cette coexistence de bandes résultant des séquences des deux allèles (normal et muté) (Figure 25-B).

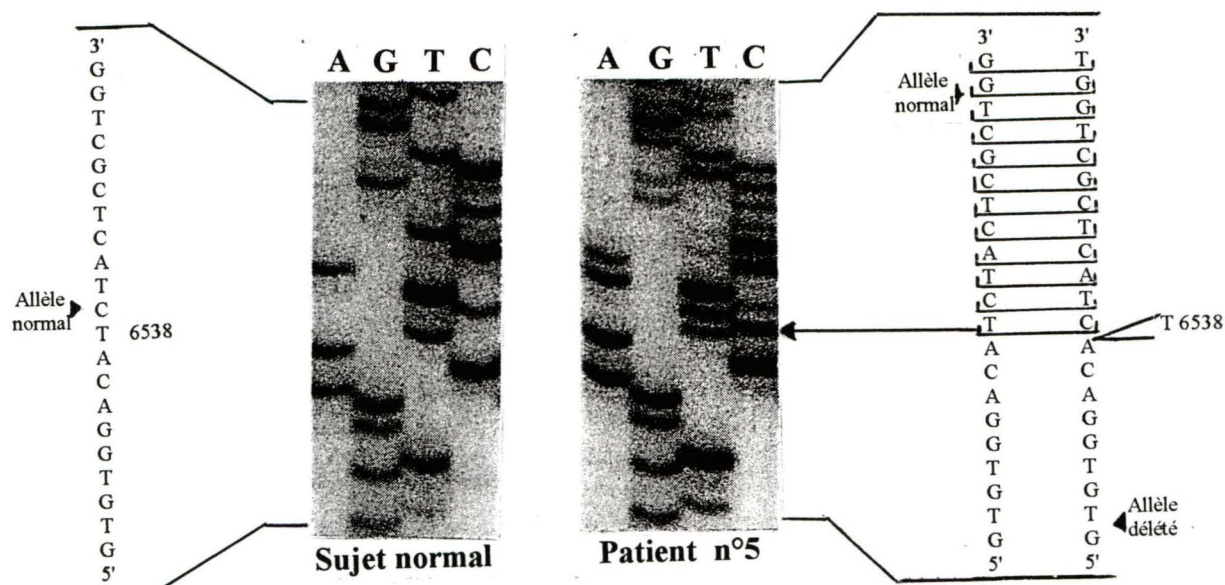
Les conséquences moléculaires de cette délétion est évidemment le décalage du cadre de lecture de l'ARNm de l'allèle muté entraînant la modification de la composition en acides aminés de la protéine formée (Figure 25-C).





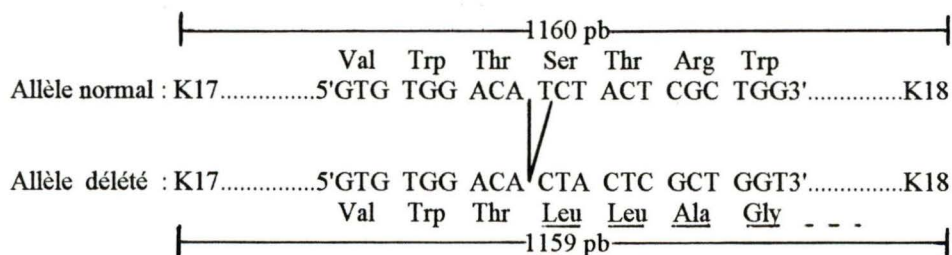
**Figure 25-A :** Polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin

Le couple d'oligonucléotide K17K18 synthétise un fragment de 1160 pb. On a remarqué la migration de type hétéroduplexe sur la piste B chez le patient n°5 (Rou 5002) par rapport au témoin normal (piste A). C'est un indice de mutations. Le fragment est séquencé directement.



**Figure 25-B :** Séquences des produits de PCR

À partir du nucléotide T 6538, on a remarqué la présence toujours de deux résidus aux mêmes niveaux chez le patient n°5. Le témoin présente normalement un seul résidu de séquence à la fois. Il s'agit d'une délétion du T en position 6538 dans l'exon 34 qui entraîne cette coexistence des résidus due au séquençage simultané d'allèle normal et muté chez le patient n°5 (Rou 5002).



**Figure 25-C :** Conséquence moléculaire de la délétion T 6538

La mutation 6538 (délétion T) entraîne un décalage de cadre de lecture (ex : la transformation de la sérine TCT en position 2201 en leucine CTA). Il y a donc un changement de la composition en acides aminés de la neurofibromine provenant de l'allèle muté.

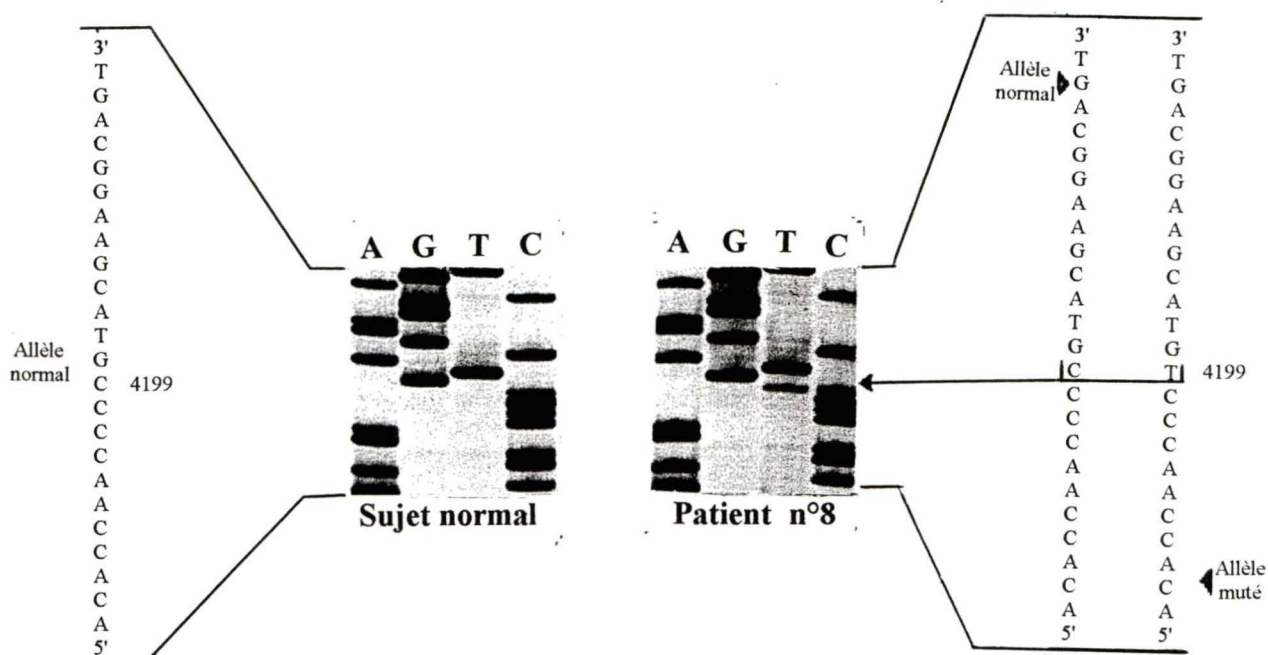
**Figure 25 :** La délétion T 6538 détectée par SSCP

### **III-3-L'amplification par PCR suivie d'un séquençage.**

C'est la technique idéale pour détecter les mutations parce qu'on identifie directement les mutations sans passer par des étapes intermédiaires comme le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin, l'électrophorèse en gradient de dénaturation ou la méthode de la protéine tronquée. Nous avons mis au point la technique d'amplification de produits de PCR suivie d'un séquençage en utilisant les amorces d'amplification par PCR comme amorces de séquençage pour essayer de déterminer les mutations du gène NF1 responsable de la maladie de neurofibromatose.

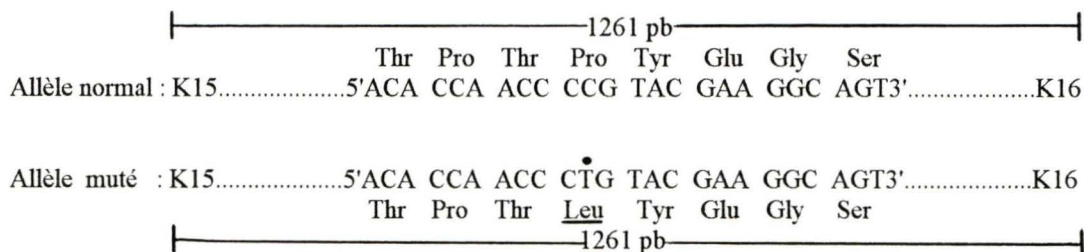
Nous avons tenté d'identifier la mutation du gène NF1 du patient n° 8 (Rou 5882) qui présente toutes les caractéristiques de la neurofibromatose, mais surtout la présence de neurofibrosarcomes, qui est la dégénérescence maligne du neurofibrome. Nous avons choisi la région amplifiée par le couple d'amorce K15-K16, qui contient le domaine GRD et où on enregistre beaucoup de mutation.

Nous avons remarqué une bande supplémentaire de T qui se trouve à même niveau que la bande normale C en position 4199 (Figure 25-A). C'est une mutation ponctuelle 4199 C en T dans l'exon 24. Notons que le résidu T muté est moins marqué que le résidu C normal. Cette mutation faux sens transformait la proline 1421 (CCG) en leucine (CTG) (Figure 25-B). Est-ce que cette mutation est responsable du déclenchement de la maladie ou un simple polymorphisme au sein de la population ou responsable de la transformation maligne de la neurofibrome en neurofibrosarcome parce que cette mutation modifie la fonction suppresseur de tumeurs de la neurofibromine ? Cette question se pose toujours en présence d'une mutation spontanée.



**Figure 26-A :** Séquençage direct des produits de PCR

Le couple d'oligonucléotide K15K16 synthétise un fragment de 1261 pb. Cette portion d'ADN englobe une partie de la région GRD (GTPase Related Domain) et les exons 21 à 27b. On a remarqué la coexistence des résidus C et T en position 4199 chez le patient n°8 (5882). Le témoin normal présente à cette position le seul résidu C. Il s'agit d'une mutation ponctuelle C-->T. Notons que le résidu de séquence muté T est moins marqué que le résidu normal C 4199.



**Figure 26-B :** Conséquence moléculaire de la mutation ponctuelle

La mutation ponctuelle 4199 (C-->T) transforme la proline (CCG) en position 1421 en leucine (CTG). Il s'agit d'une mutation faux sens. Est-ce que cette mutation est responsable de la manifestation de la maladie ou la dégénérescence maligne du neurofibrome ?

**Figure 26 :** La mutation P1421L identifiée par séquençage direct

N°	Patients	PCR	Mutations		
			Localisation	Nature	Conséquences
2	Rou 262	K7K8	Exon 28	Mutation 5097 (Délétion 13 pb)	Décalage du cadre de lecture  Arrêt de la traduction
5	Rou 5002	K17K18	Exon 34	Mutation 6538 (Délétion T)	Décalage du cadre de lecture
8	Rou 5882	K15K16	Exon 24	Mutation 4199 (C--->T)	Mutation faux sens (P1421L)

**Tableau 7 :** Mutations caractérisées chez les patients NF1 sporadiques

Le tableau montre les mutations identifiées chez les patients atteints de la neurofibromatose d'une façon sporadique dans la clinique de neurofibromatose de l'Estrie. Pour chaque patient, le PCR, la localisation, la nature et les conséquences moléculaires sont indiqués.



## **CHAPITRE IV : DISCUSSIONS ET COMMENTAIRES**

### **I-La clinique de la neurofibromatose.**

Les critères diagnostiques de la neurofibromatose ont été développés par NIH en 1987. Les manifestations pathologiques observées à la clinique de neurofibromatose de l'Estrée ressemblent beaucoup aux descriptions de la neurofibromatose de type I déjà publiées.

Nous avons diagnostiqué les taches café au lait sur 90% des patients, c'est le symptôme majeur de cette maladie. Riccardi décrit l'extrême variabilité des manifestations cliniques de la neurofibromatose ; il a remarqué aussi que 90% des patients présentent des taches café au lait (Riccardi, 1992). C'est aussi le premier motif de consultation à la clinique de neurofibromatose.

Quant aux neurofibromes, nous les avons décelé seulement chez 2% des patients à cause de la moyenne d'âge très basse. Les neurofibromes sont présents en majorité à l'âge adulte (Riccardi, 1992).

Le nodule de Lisch est un signe pathognomonique de la NF1 ; nous l'avons retrouvé seulement chez 14% des cas. Ce résultat est biaisé à cause de l'âge des enfants et le nombre restreint des patients qui ont subi des examens ophtalmologiques complets. Selon Riccardi, il y a une corrélation très significative entre nodules de Lisch et sévérité des manifestations dermatologiques de NF1. Il a observé cet hamartome pigmenté irien chez 70% des cas adultes atteints de neurofibromatose (Riccardi, 1992).

Le retard du développement et l'échec scolaire ont été signalés respectivement chez 10% des patients. Il y a une corrélation statistiquement significative entre problèmes visuels, auditifs, oraux et les baisses de rendement scolaire (Riccardi, 1992).

Nous allons profiter à la prochaine fois les banques de données informatisées des patients atteints de la neurofibromatose et leurs familles pour faire des études multivariées des symptomatologies cliniques d'une part, et d'autre part établir l'incidence et la prévalence de cette maladie dans la région de l'Estrie pour améliorer le diagnostic et la prise en charge de cette maladie.

## **II-Le diagnostic moléculaire indirect.**

Dès que l'ADN génomique des organismes supérieurs est devenu accessible à l'analyse, il est apparu que la séquence d'un locus donné pouvait varier d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce. Ces variations stables et transmises de manière mendélienne traduisaient un polymorphisme génotypique, substratum moléculaire de la diversité phénotypique intra-spécifique des individus.

Le polymorphisme de restriction est la variation individuelle de la séquence de l'ADN révélée par des modifications du site de restriction, ce qui engendre seulement deux versions alternatives possibles la présence (+) ou l'absence (-) du site de restriction. Un RFLP doit correspondre à un locus bien individualisable sur le génome et être informatif.

Les microsatellites sont un exemple de répétition en tandem où le motif de base est très court (2 à 4 paires de nucléotides) ; en fait, les microsatellites de type  $(CA)_n/(GT)_n$  ont un intérêt particulier, ils sont remarquablement abondants et uniformément distribués, ce qui représente un exemplaire tous les 25 à 100 kb. De plus, ils sont très polymorphes, le nombre d'allèles observé est d'autant plus grand que le microsatellite est plus long et leur informativité est élevée. Avec  $PIC > 0.6$  pour plus de 50% d'entre eux, les microsatellites sont presque très informatifs par rapport aux minisatellites et RFLP.

Nous avons étudié les polymorphismes du gène NF1 pour déterminer l'allèle porteur de la maladie au sein de la famille. Les marqueurs à notre disposition sont très polymorphes et informatifs. Ces explorations aussi sont moins chères et facilement réalisables. Certaines études ont été capables de prédire à 90% la présence ou absence de la maladie en utilisant les marqueurs au sein du gène NF1 (Upadhyaya et al., 1992; Tassabehji et al., 1993).

Au cours de cette étude, nous avons utilisé quatre marqueurs microsatellites et un marqueur RFLP. Sur 75 individus analysés, les microsatellites étaient nettement plus informatifs que le RFLP en terme de pourcentage d'hétérozygotie. Les microsatellites sont multi-alléliques par rapport à la forme bi-allélique du RFLP, ce qui démontre clairement l'avantage des microsatellites par rapport au RFLP dans l'analyse des haplotypes. L'utilisation des marqueurs génétiques qui devient facilement réalisable avec la technique de PCR nous a permis d'identifier des mutations grâce à la perte d'hétérozygotie.

Nous avons aussi profité des résultats des différents marqueurs utilisés pour faire un exercice d'analyse statistique et de vérifier certaines hypothèses. Nous avons essayé de trouver une relation entre la présence ou absence du site de restriction Rsa I et la neurofibromatose, nous avons conclu qu'il n'y a pas de relation c'est à dire que la présence ou absence du site ne signifie rien à la manifestation de la maladie et c'est une variation normale au sein de la population et traduit même le terme polymorphisme employé pour le RFLP. Nous avons aussi remarqué la différence relative en terme de moyenne arithmétique entre les longueurs de microsatellites chez les patients et les sujets non atteints, cette différence est due à la présence des deux délétions et qui entraîne une diminution des moyennes chez les patients et l'analyse statistique nous démontre qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes, les valeurs de p selon le test de Student sont supérieures à 0.05. Ce qui démontre encore une fois que les microsatellites sont des polymorphismes, des variations normales au sein de la population et même leurs situations dans les introns ne favorisent pas leurs participations dans la manifestation pathologique de la maladie.

Dans les seize cas familiaux analysés, les marqueurs génétiques ont permis d'identifier l'allèle porteur de la mutation (allèle en noir), cet allèle est présent chez tous les individus atteints d'une même famille et absent chez les membres non atteints à l'exception de la famille "M" où un membre est asymptomatique et la famille "F" où on est en présence d'un cas sporadique. Ce qui signifie que le diagnostic moléculaire de NF1 dans les cas familiaux continue d'être indirect en se basant sur l'étude de linkage par analyse des haplotypes, et dans le cas sporadique, la seule alternative demeure le diagnostic direct par identification de mutations impliquées dans la maladie.

Pour ce qui est de la famille "M", l'individu asymptomatique (II:2, 65) s'est montré porteur de l'allèle muté comme sa soeur malade (II:1, 64), ce qui s'explique de deux façons : soit que le garçon (II:2, 65) est porteur de la maladie mais il n'a pas encore développé encore les symptômes de la neurofibromatose; soit qu'il s'est produit une recombinaison génétique (conversion génique) chez l'enfant (II:2, 65) permettant de transférer la région mutée seulement sur l'autre allèle lors de la méiose. Pour vérifier cette possibilité, il faudra analyser les régions flanquant le gène NF1 par utilisation de marqueurs extragéniques.

Chez deux familles (Familles "H" et "L"), les marqueurs nous ont permis d'identifier deux mutations de délétion résultant une perte d'hétérozygotie chez les individus atteints de la neurofibromatose. Concernant la famille "L" (Figure 17), c'est le marqueur RFLP qui nous a permis d'identifier cette délétion. On remarque que les enfants atteints (III:1, 60 et III:2, 61) ont hérité de l'allèle + (450 pb) de leur père (II:2, 59) alors qu'ils leur manquent l'autre allèle (500 pb) de leur mère atteinte (II:1.58). En observant les différents marqueurs utilisés, on peut conclure que la délétion couvre la région s'étendant de l'exon 5 et s'arrêtant quelque part avant l'intron 26, parce que les individus (III:1, 60 et III:2, 61) sont hétérozygotes pour les autres marqueurs, et que cette mutation est d'origine paternelle. L'allèle (-, 210, 215, 108, 187) du grand-père (I:1, 56) a subi la délétion.

Concernant le cas de la famille "H"(Figure 13), on remarque que les individus atteints (I:2, 34 et II:1, 35) sont hémizygotes pour tous les marqueurs. L'enfant malade (II:1, 35) possède seulement l'allèle provenant du père (I:1, 33). Les marqueurs disponibles nous ont permis

d'identifier une délétion couvrant la région qui s'étend de l'exon 5 à l'intron 38 et qui va peut être au-delà. Des grandes délétions qui impliquent plusieurs introns et exons ont été signalées dans le gène NF1 responsable de l'expression de la maladie (Upadhyaya et al., 1992)

Concernant la famille "F" (Figure 11) où on a diagnostiqué un cas sporadique, on remarque bien que c'est une mutation nouvelle responsable de la maladie parce qu'aucun des parents n'est atteint de la neurofibromatose. Cette famille a été analysée dans le but de vérifier si la nouvelle mutation présente est une délétion. Le résultat ne montre aucune forme de perte d'hétérozygotie et par conséquent aucune délétion couvrant les marqueurs analysés. Selon la littérature, 50% de la maladie est d'origine sporadique (Riccardi, 1992)

### **III-La détection des mutations.**

La technique permettant de caractériser les mutations ponctuelles responsables de maladies héréditaires et donc d'accéder au diagnostic direct a connu un important développement au cours des dernières années, principalement grâce à la technique de PCR. Il est maintenant techniquement possible de les caractériser rapidement. Le plus difficile est de démontrer que la différence de séquence observée est bien celle qui est responsable de la maladie et qu'elle ne correspond pas au simple polymorphisme de séquence. Des polymorphismes de séquence présentent néanmoins un intérêt pour le diagnostic, car ils représentent de nouveaux marqueurs polymorphes utilisables pour le diagnostic indirect.

Le diagnostic direct par recherche de mutations de NF1 permet d'identifier les mutations impliquées dans la survenue des manifestations cliniques de NF1. Ce diagnostic moléculaire direct est très important dans les cas sporadiques de la neurofibromatose. Les connaissances concernant la pathologie du gène NF1 de la neurofibromine sont encore incomplètes. En effet, seules quelques mutations de la maladie ont été identifiées, la plupart de ces mutations sont des mutations ponctuelles résultant d'une substitution, d'insertion ou de délétion (Upadhyaya et al., 1995).

Au cours de ce projet, nous avons recherché les mutations du gène NF1 à partir de l'ARNm par analyse des produits de RT-PCR sur gel d'agarose, sur gel polyacrylamide non dénaturant, par polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (SSCP) et par séquençage direct.

L'analyse des produits de RT-PCR sur gel d'agarose permet d'identifier les grandes délétions ou insertions, alors que l'électrophorèse en gel d'acrylamide non dénaturant permet de révéler les petites délétions et insertions. Les résultats d'analyse chez huit individus atteints de NF1 ne montrent aucune différence par rapport au sujet non atteint sur gel d'agarose. Mais, nous avons observé la présence d'une bande supplémentaire en dessous du fragment de taille normal chez le patient n°2 avec les produits amplifiés par K7K8, il s'agit d'une délétion de 13 pb au niveau de l'exon 28. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture (frameshift mutation) du gène NF1 et arrêt de la traduction de la neurofibromine.

Notons la différence de quantité entre les deux bandes, très marquée pour la bande normale et moins pour la bande supplémentaire. Des études ont montré une expression réduite de l'ARNm correspondant à l'allèle muté par rapport à l'allèle normal, suggérant ainsi la présence des mutations pouvant affecter la région 5' promotrice du gène ou la région 3' non codante résultant en un dérèglement du niveau de transcription; diminution de la stabilité de l'ARNm en empêchant la maturation de l'ARNm par épissage (Bodrich et al., 1995; Upadhyaya et al., 1995). Dans le contexte NF1, ce phénomène d'instabilité semble prendre une place particulière. En effet, des travaux ont étudié les niveaux d'expression des deux allèles de 15 patients NF1, hétérozygotes pour le RFLP/Rsa I, et ont montré que 13 d'entre eux présentaient un déséquilibre d'expression allélique. Ces résultats montrent que l'instabilité de l'ARNm dépasse le cadre des mutations non-sens, il pourrait être la conséquence de mutations frameshift et des régions régulatrices du gène (Heim et al., 1994 et Shen et al., 1996).

La structure secondaire que prend un segment d'ADN simple brin est fonction de sa séquence. Une mutation ponctuelle au sein de cette séquence modifie en général suffisamment la structure secondaire pour qu'il en résulte une modification de la migration en électrophorèse. Cette propriété permet de mettre en évidence la présence d'une mutation ponctuelle. Cette technique, appelée SSCP, a été mise au point par Orita et al., en 1989, à partir de l'ADN génomique; elle est maintenant réalisée à partir de l'ADN amplifié par la technique de PCR.



En utilisant le polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin avec les produits de RT-PCR, nous avons remarqué une migration de type hétéroduplexe chez le patient n°5 (Rou 5002) avec le produit amplifié par le couple K17K18, nous avons séquencé directement le fragment et nous avons remarqué qu'à partir T en position 6538, nous avons lu deux bandes de séquence qui se retrouvent au même niveau, il s'agit d'une délétion d'une base T en position 6538 qui entraîne une modification du cadre de lecture (frameshift mutation) et une conséquence majeure sur la formation des protéines.

De courtes séquences répétées sont souvent retrouvées au voisinage des délétions de petite taille (moins de 20 pb) et seraient impliquées dans leur survenue par un mécanisme de dérapage réplcatif (Krawczak et al., 1991). Ce type de séquence a déjà été impliqué dans les petites délétions du gène NF1 (Upadhyaya et al., 1997). Accréditant cette hypothèse, les deux délétions que nous avons observées ne comportent aucune séquence répétée.

La méthode d'amplification par PCR suivie d'un séquençage est encore lourde maintenant, mais elle pourrait à l'avenir remplacer toutes les techniques classiques de détection de mutations. Les avantages de pratiquer cette expérience sont multiples: la mutation n'a pas à être connue au préalable, elle est caractérisée directement. La technique permet d'étudier aussi bien les mutations que les polymorphismes, qu'ils varient de séquences ou de répétition. La technique n'est pas soumise aux aléas des hybridations, de la stringence, des digestions enzymatiques. Cette technique deviendra alors la technique de choix.

Nous avons choisi de séquencer le produit d'amplification par le couple K15K16 chez le patient n°8 (Rou 5882) qui présente tous les signes cliniques de la neurofibromatose de type 1 plus la neurofibrosarcome qui est la dégénérescence maligne du neurofibrome. La région amplifiée par K15K16 contient le domaine GRD (GTPase Related Domain) et où on enregistre beaucoup de mutation recensée. Nous avons trouvé une mutation ponctuelle C-->T en position 4199 dans l'exon 24 transformant ainsi la proline en position 1421 en leucine.

Le mécanisme de mutation est la méthylation de la cytosine suivie de la désamination oxydative aboutit à la transition C en T. Cette dernière, dans les îlots CpG, est responsable de 12 mutations répertoriées jusqu'à date, 9 d'entre elles se retrouvent dans l'exon 31, les autres se retrouvent dans les exons 10, 29 et 42 (Upadhyaya et al., 1995; Shen et al., 1996; Rodenhiser et al., 1997).

La présence d'ADN méthylé à l'intérieur des régions de gènes apparaît comme étant la cause principale de mutation ponctuelle responsable de maladie chez l'homme, puisque 25% des mutations ponctuelles détectées dans des pathologies humaines concernent les dinucléotides CpG et conduit à une 5 - méthylcytosine (5mC). La fréquence de ce nucléotide au sein du génome humain se retrouve à un niveau largement inférieur (environ 5 fois moins) que celui prévu par un calcul fondé sur la fréquence des bases C et G. De plus, cette distribution n'est pas aléatoire, puisqu'il existe des zones bien précises riches en CpG appelées "îlots CpG" (Krawczak et al., 1991; Rodenhiser et al., 1993; Clark et al., 1995)

La présence de cytosines méthylées au sein du gène NF1, y compris à l'intérieur de la région codante, a récemment été démontrée par Rodenhiser et al, 1993. Ils suggèrent que la méthylation de 107 dimères CpG des parties codantes du gène NF1 sert de réservoir au sein duquel se produisent les transitions C en T, contribuant ainsi aux taux de mutation très élevés de cette maladie (Rodenhiser et al., 1993; Andrews et al., 1996; Upadhyaya et al., 1997).

La mutation détectée s'accompagne d'une différence quantitative entre l'ARN normal et l'ARN muté. Cette constatation traduite par la très faible intensité de la bande anormale correspond à la thymine. Ce phénomène démontre que les mutations réduisent la quantité des ARNs en affectant sa stabilité nucléaire ou encore en modifiant ses capacités d'exportation vers le cytoplasme, donc la transmission dominante de la neurofibromatose de type 1 est liée dans ce sens à un effet gène-dosage (Bodrich et al., 1995; Shen et al., 1996).

Est-ce que cette mutation ponctuelle est une vraie mutation responsable de la manifestation clinique de la maladie ou elle est impliquée dans la transformation maligne de la neurofibrome ou elle est un simple polymorphisme de séquence c'est à dire une simple variation normale de séquence au sein de la population ? Pour répondre à cette question, il faut séquencer au complet l'ADNc du gène NF1 du patient n°8 et ses deux garçons dont l'un n'est pas malade. Si la mutation se retrouve chez les trois individus, on parle d'un simple polymorphisme de séquence. Si la mutation est détectée seulement chez les deux personnes atteintes de NF1, elle est responsable de la maladie. Enfin, si la mutation est identifiée seulement chez le patient n°8, elle est impliquée dans la dégénérescence maligne du neurofibrome et on vérifie la théorie de deux

mutations de Knudson, la première mutation qui est germinale et se retrouve chez la mère et un de ses deux garçons responsable de la manifestation clinique de la maladie ; la deuxième mutation qui est somatique, responsable de l'apparition des tumeurs et se retrouve seule chez la mère.

Dans cette thèse, nous décrivons une stratégie simple pour identifier et caractériser la mutation délétère chez huit cas sporadiques de la neurofibromatose de type 1. Trois mutations ont été caractérisées respectivement par gel polyacrylamide, par polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin et par séquençage direct des produits de PCR. Ces trois mutations rapportées sont décrites pour la première fois.

Bien que le gène NF1 a été cloné en 1990, ses anomalies moléculaires restent peu documentées. Notre stratégie nous a permis d'identifier la mutation causale chez 25% des patients étudiés. Ces résultats sont en accord avec les données du consortium international d'analyse génétique. Il s'agit d'une amélioration certaine comme techniques classiques de détection de mutations ponctuelles. Par ces techniques, des études n'identifiaient la mutation NF1 que chez 29 des 300 patients testés (Upadhyaya et al., 1995). L'utilisation à plus grande échelle du séquençage direct permettra d'avancer dans la connaissance des anomalies moléculaires du gène et d'explorer la totalité de la séquence codante.

Les mutations identifiées sont réparties sur l'ensemble de la séquence codante, contrairement aux données qui décrivaient une répartition homogène (Heim et al., 1995 et Shen et al., 1996), deux des trois mutations identifiées sont situées dans le domaine GRD.

## **CHAPITRE V : CONCLUSIONS**

Le diagnostic de la maladie de Von Recklinghausen est avant tout clinique. Néanmoins, étant donné l'expression extrêmement variable de cette affection et la très haute fréquence des formes sporadiques, il peut être nécessaire de faire appel aux techniques de biologie moléculaire pour confirmer un diagnostic incertain ou établir un diagnostic présymptomatique.

Dans les cas familiaux, le diagnostic indirect reposant sur l'analyse des ségrégations des polymorphismes de l'ADN est utilisé. Les marqueurs intragéniques ou extragéniques sont très polymorphes et informatifs. Leur détermination n'est pas chère et facilement réalisable.

Dans les cas sporadiques, l'utilisation des polymorphismes de l'ADN est la plupart du temps inopérante, puisque la neurofibromatose est une maladie dominante. Le diagnostic moléculaire direct est alors la seule possibilité. Il est à noter cependant que la détection du gène muté ne permettra pas encore de savoir si l'affection revêtira une forme bénigne voire frustre ou même une forme très sévère.

Les polymorphismes du gène codant pour la neurofibromine sont également utilisés pour étudier dans les tumeurs malignes les pertes de l'hétérozygotie du locus NF1. 20% des patients atteints de neurofibromatose vont présenter des cancers (Riccardi, 1992).

Les polymorphismes de site de restriction (RLFP) bi-alléliques dont l'informativité est très limitée vont être remplacés par les microsatellites dont l'informativité est supérieure à 80% et ils sont analysables par PCR. Ils sont particulièrement utiles pour la recherche de pertes d'hétérozy-

goties du locus NF1 dans différents cancers et pour l'étude de la ségrégation de la maladie dans les formes familiales.

Malgré la grande taille du gène, les recherches de mutation sont peu fructueuses. Seules 180 mutations ont été retrouvées. Ces mutations ne touchent pas systématiquement le domaine GAP. L'exon 31 est le plus fréquemment touché (Upadhyaya et al., 1995). Le promoteur du gène est encore mal connu, ainsi que la région 3' qui n'a pas encore été clonée (Cawthon et al., 1990b ; Upadhyaya et al., 1995). Des mutations dans ces régions pourraient entraîner des modifications d'expression du gène ou la stabilité du messager. Une duplication en 3' du gène, responsable dans une famille, d'une association de NF1, syndrome Noonan et Watson, semblerait confirmer l'existence d'au moins un autre domaine fonctionnel. Cette duplication est très strictement associée à ce phénotype. Elle est à l'origine d'une protéine anormale, c'est la seule association connue à ce jour entre le type de mutation et un phénotype (Tassabehji et al., 1993).

En effet, une étude portant sur 175 individus de 48 familles, incluant 6 paires de jumeaux monozygotes, a permis de démontrer que l'expression phénotypique de NF1 due à différents types de mutations du gène NF1 est trop hétérogène et doit faire intervenir l'expression de gènes modificateurs spécifiques d'un trait de la maladie, chaque trait pouvait apparaître indépendamment l'un de l'autre. Pour les taches café au lait et les neurofibromes, la corrélation est plus forte chez les jumeaux monozygotes qu'entre apparentés de premier degré et baisse encore pour des parents plus éloignés. Cela suggère que bien que les mutations du gène NF1 jouent un rôle majeur dans l'expression de la maladie, le type de mutation joue un rôle mineur dans la variation de l'expression (Riccardi, 1992).

En dépit des incertitudes actuelles sur le rôle physiologique exact de NF1 sur la prépondérance d'expression de la maladie dans les tissus d'origine neuroectodermique. La recherche sur le gène NF1 laisse espérer une meilleure compréhension des processus de prolifération cellulaire, en particulier lors des transformations malignes observées au cours de la maladie. Pour le moment, les travaux sur le gène NF1 facilite le diagnostic des sujets transmetteurs et constitue une aide au conseil génétique qui demeurera difficile en raison de la grande variabilité d'expression de la maladie.

L'exploitation des modèles animaux récemment construit devrait permettre de mieux comprendre le rôle de la neurofibromine dans la régulation de p21<sup>RAS</sup> et ainsi de mieux cerner les conséquences de la mutation de ce gène selon le type de cellule dans lequel il s'exprime (Hinrichs et al., 1987 ; Silva et al., 1997).

Enfin, la recherche de mutations à partir de l'ARNm du gène NF1 grâce au séquençage systématique et automatique de l'ADNc devrait nous permettre de diagnostiquer la nature de la mutation du transmetteur même en cas de mutations nouvelles, d'étudier le mécanisme pathologique de la neurofibromine, de contribuer à l'élaboration d'une corrélation entre la nature de la mutation et le phénotype clinique et évolutif de la maladie et d'aider les études fonctionnelles et néoplasiantes de la neurofibromine.

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je tiens à remercier les organismes qui m'ont apporté leurs supports respectifs: l'Agence Canadienne de Développement International (ACDI) et le Ministère de la santé à Madagascar.

Enfin, il est important de souligner ici que ce travail n'aurait pu avoir lieu sans l'aide précieuse et généreuse de beaucoup de gens de mon entourage. Je remercie donc toutes ces personnes qui m'ont supporté d'une façon ou d'une autre à accomplir ma tâche rendue presque impossible.



## BIBLIOGRAPHIE

Abeliovich, D.; Gelman-Kohan, Z.; Silverstein, S.; Lerer, L.; Chemke, J.; Merlin, S.; Zlotogora, J.: **Familial cafe au lait spots: a variant of neurofibromatosis type 1.** J. Med. Genet. 32: 985-986, 1995.

Andersen, L.B. ; Ballester, R. ; Marchuck, D.A. ; Chang, E. ; Gutman, D.H. ; Saulino, A.M. ; Camoni, J. ; Wigler, M. ; Collins, F.S. : **A conserved alternative splice in the Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produce two isoforms both of which have GTPase activating protein activity.** Mol. Cell Biol., 13 :487-497, 1993.

Andrews, J.D. ; Mancini, D.N. ; Singh, S.M. ; Rodenhiser, D.I. : **Site and sequence specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) gene include C5839T the site of the recurrent substitution mutation in exon 31.** Hum. Mol. Genet., 5 :503-507, 1996.

Ainsworth, P.J.; Rodenhiser, D.I.; Costa, M.T.: **Identification and characterization of sporadic and inherited mutation in exon 31 of the neurofibromatosis (NF1) gene.** Hum. Genet. 91: 151-156, 1993.

Barker, D.; Wright, E.; Nguyen, K.; Cannon, L.; Fain, P.; Goldgar, D.; Bishop, D.T.; Carey, J.; Baty, B.; Kivlin, J.; Willard, H.; Wayne, J.S.; Greig, G.; Leinwand, L.; Nakamura, Y.; O'Connell, P.; Leppert, M.; Lalouel, J.-M.; White, R.; Skolnick, M.: **Gene for Von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17.** Science 236: 1100-1102, 1987.

Bodrich, A. ; Griesser, J. ; Horn, D. ; Kaufmann, D. ; Krone, W. ; Nurnberg, P. : **Reduced neurofibromin content but normal GAP activity in a patient with neurofibromatosis type 1 caused by a five base pair duplication in exon 12b of the NF1 gene.** Biochem. Biophys. Res. 214 :895-904, 1995.

Buchberg, A.M.; Cleveland, L.S.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G.: **Sequence homology shared by neurofibromatosis type 1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway.** Nature 347: 291-294, 1990.

Carmant, L.; Lemieux, B.; Guité, C. : **Neurofibromatosis and its neurological complication in the Eastern Township Population.** 19th annual meeting of child neurology society, Annals of Neurology 28 : 439, 1990.

Cawthon, R.M.; Viskochil, D.; O'Connell, P.; Buchberg, A.; Anderson, L.; Wallace, M.; Marchuk, D.; Stevens, J.; Culver, M.; Xu, G.; Collins, F.S.; Jenkins, N.; Copeland, N.; White, R.: **Identification and characterization of several genes between or nearby neurofibromatosis type 1 translocation breakpoints.** Am. J. Hum. Genet. 47 (suppl.): A109, 1990a.

Cawthon, R.M.; Weiss, R.; Xu, G.; Viskochil, D.; Culver, M.; Stevens, J.; Robertson, M.; Dunn, D.; Gesteland, R.; O'Connell, P.; White, R.: **A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations.** Cell 62: 193-201, 1990b.

Chalhoub, N. : **Diagnostic moléculaire de la neurofibromatose de type 1** Mémoire de maîtrise, 1997.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. : **Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction.** Anal. Biochem. 162 :156-159, 1987.

Clark, S. ; Harrison, J. ; Frommer, M. : **CpNpG methylation in mammalian cells.** Nature Genet. 10 : 20-27, 1995.

Clementi, M. ; Gelehrter, T.D. : **Principe de génétique moléculaire et médicale** Ed. Pradel, 1992.

Colman, S.D.; Williams, C.A.; Wallace, M.R.: **Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene.** Nature Genet. 11: 90-92, 1995a.

Colman, S. ; Collins, F. ; Wallace, M.R. : **Characterization of the single base-pair deletion in neurofibromatosis type 1.** Hum. Mol. Genet. 2 : 1709-1711, 1995b.

Cummings, L.M. ; Trent, J.M. ; Marchuk, D.A. : **Identification and mapping of the NF1 homologous loci.** Cytogenet. Cell Genet. 73 : 334-340, 1996.

Danglot, G.; Regnier, V.; Fauvet, D.; Vassal, G.; Bernheim, A. :**Neurofibromatosis 1 : mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene.** Hum. Mol. Genet. 4 : 915-920, 1995.

DeClue, J.E. ; Cohen, B.D. ; Lowy, D.R. : **Identification and characterization of neurofibromatosis type 1 protein product.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 9914-9918, 1991.

DeClue, J.E.; Papageorge, A.G.; Fletcher, J.A.; Diehl, S.R.; Ratner, N.; Vass, W.C.; Lowy, D.R.: **Abnormal regulation of mammalian p21 (ras) contributes to malignant tumor growth in Von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis.** Cell. 69: 265-273, 1992.

Estivill, X.; Lázaro, C.; Casals, T.; Raveña, A.: **Recurrence of a nonsense mutation in the NF1 gene causing classical neurofibromatosis type 1.** Hum. Genet. 88: 185-188, 1991.

Eisenbarth, I. ; Hoffmeyer, S. ; Kaufmann, D. ; Assum, G. ; Krone, W. : **Analysis of an alternately spliced exon of the neurofibromatosis type 1 gene in the cultured melanocytes from patients with neurofibromatosis 1.** Arch. Dermatol. Res. 287 : 413-416, 1995.

Etienne, J.; Millot, F.: **Biochimie génétique -Biologie moléculaire** . 3éd. Masson, 1993.

Fountain, J.W.; Wallace, M.R.; Brereton, A.M.; O'Connell, P.; White, R.L.; Rich, D.C.; Ledbetter, D.H.; Leach, R.J.; Fournier, R.E.K.; Menon, A.G.; Gusella, J.F.; Barker, D.; Stephens, K.; Collins, F.S.: **Physical mapping of the Von Recklinghausen neurofibromatosis region on chromosome 17.** Am. J. Hum. Genet. 44: 58-67, 1989.

Friedman, J.M.; Birch, P.; Greene, C.; the NNFF International Database Participants: **National Neurofibromatosis Foundation International Database.** Am. J. Med. Genet. 45: 88-91, 1993.

Grifa, A.; Piemontese, M.R.; Melchionda, S.; Gasparini, P. **Screening of neurofibromatosis type 1 gene : identification of a large deletion and of an intronic variant.** Clin. Genet. 47: 281-284, 1995.

Guité, C.; Lemieux, B. : **Clinique de neurofibromatose de l'Estrie.** Rapport de stage d'Eté. 1992.

Heim, R.A.; Silverman, L.M.; Farber, R.A.; Kam-Morgan, L.N.; Luce, M.C.: **Screening for truncated NF1 proteins.** Nature Genet. 8: 218-219, 1994.

Heim, R.A.; Kam-Morgan, L.N.; Binnie, C.G.; Corns, D.D.; Cayouette, M.C.; Farber, R.A.; Aylsworth, A.S.; Silverman, L.M.; Luce, M.C.: **Distribution of 13 truncating mutations in the neurofibromatosis 1 gene.** Hum. Molec. Genet. 4: 975-981, 1995.

Hinrichs, S.H.; Nerenberg, M.; Reynolds, R.K.; Khoury, G.; Jay, G.: **A transgenic mouse model for human neurofibromatosis.** Science 237: 1340-1343, 1987.

Hoffmeyer, S.; Gunter, A. : **A Rsa I polymorphism in the transcribed region of the neurofibromatosis (NF1) gene.** Hum. Genet. 93 : 481-482, 1994a.

Hoffmeyer, S.; Gunter, A.; Kaufmann, D.; Schwenk, K.; Krone, W. : **A deletion in the 5' region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.** Hum. Genet. 94 : 97-100, 1994b.

Horiuchi, T.; Hatta, N.; Matsumoto, M.; Ohtsuka, H.; Collins, F.S.; Kobayashi, Y.; Fujita, S.: **Nonsense mutation at arg-1947 in two cases of familial neurofibromatosis type 1 in Japanese.** Hum. Genet. 93: 81-83, 1994.

Kaplan, J.C.; Delpech, M. : **Biologie moléculaire et médecine**. Médecine-Sciences Flammarion, 1994.

Kayes, L.M.; Burke, W.; Riccardi, V.M.; Bennett, R.; Ehrlich, P.; Rubenstein, A.; Stephens, K.: **Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients**. Am. J. Hum. Genet. 54: 424-436, 1994.

Knudson, A.G. : **Mutation and cancer : Statistical study of retinoblastoma**. Proc. Natl. Acad. Sci. 68 : 320-328, 1971.

Krawczak, M. ; Cooper, D.N. : **Gene deletions causing human genetic disease : mechanism and the role of the local DNA sequence environment**. Hum. Genet. 86 : 426-441, 1991.

Lazaro, C.; Gaona, A.; Xy G.; Weiss, R.; Estivill, X.: **A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene**. Hum. Genet. 92: 429-430, 1993.

Lazaro, C.; Gaona, A.; Estivill, X.: **Two CA/GT repeat polymorphisms in intron 27 of the human neurofibromatosis type I (NF1) gene**. Hum. Genet. 93: 351-352, 1994.

Lazaro, C.; Kruyer, H.; Gaona, A.; Estivil, X.: **Two further cases of mutation R1947X in the NF1 gene: screening for a relatively common recurrent mutation**. Hum. Genetics. 96 : 361-363, 1995.

Ledbetter, D.H.; Rich, D.C.; O'Connell, P.; Leppert, M.; Carey, J.C.: **Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation**. Am. J. Hum. Genet. 44: 20-24, 1989.

Legius, E.; Marchuk, D.A.; Hall, B.K.; Andersen, L.B.; Wallace, M.R.; Collins, F.S.; Glover, T.W.: **NF1-related locus on chromosome 15**. Genomics 13: 1316-1318, 1992.

Legius, E.; Marchuk, D.A.; Collins, F.S.; Glover, T.W.: **Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis**. Nature Genet. 3: 122-125, 1993.

Leppig, K.A. ; Viskochil, D. ; Neil, S. ; Rubensein, A. ; Johnson, V.P. ; Zhu, X.L. ; Baothman, A.R. ; Stephens, K. : **The detection of contiguous gene deletions at the neurofibromatosis 1 locus with fluorescence in situ hybridization**. Cytogenet. Cell Genet. 72 : 95-98, 1996.

Li, Y.; Bollag, G.; Clark, R.; Stevens, J.; Conroy, L.; Fults, D.; Ward, K.; Friedman, E.; Samowitz, W.; Robertson, M.; Bradley, P.; McCormick, F.; White, R.; Cawthon, R.: **Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors**. Cell 69: 275-281, 1992.

Li, Y.; O'Connell, P.; Huntsman Breidenbach, H.; Cawthon, R.; Stevens, J.; Xu, G.; Neil, S.; Robertson, M.; White, R.; Viskochil, D.: **Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1)**. *Genomics* 25: 9-18, 1995.

Marchuk, D.A.; Saulino, A.M.; Tavakkol, R.; Swaroop, M.; Wallace, M.R.; Andersen, L.B.; Mitchell, A.L.; Gutmann, D.H.; Boguski, M.; Collins, F.S.: **cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product**. *Genomics* II: 931-940, 1991.

Martinez, J.M. ; Breidenbach, H.H. ; Cawthon, R. : **Long RT-PCR of the entire 8.5 Kb NF1 open reading frame and mutation detection on agarose gels**. *Genome Res.* 6 : 58-66, 1996.

Mashal, R.D.; Koontz, J.; Sklar J. : **Detection of mutation by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvase**. *Nature Genetics* 9 : 177-183, 1995.

Menon, A.G.; Anderson, K.M.; Riccardi, V.M.; Chung, R.Y.; Whaley, J.M.; Yandell, D.W.; Fermer, G.E.; Freiman, R.N.; Lee, J.K.; Li, F.P.; Barker, D.F.; Ledbetter, D.H.; Kleider, A.; Martuza, R.L.; Gusella, J.F.; Seizinger, B.R.: **Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in Von Recklinghausen neurofibromatosis**. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 5435-5439, 1990.

Millot, F. ; Etienne, J. : **Biochimie génétique et biologie moléculaire**. 2éd Paris Masson., 1993.

NIH Consensus Development Conference: **Neurofibromatosis: conference statement**. *Arch. Neurol.* 45: 575-578, 1988.

O'Connell, P.; Leach, R.; Cawthon, R.M.; Culver, M.; Stevens, J.; Viskochill, D.; Fournier, R.E.K.; Rich, D.C.; Ledbetter, D.H., White, R.: **Two NF1 translocations map within a 60-kilobase segment of 17q11.2**. *Science* 244: 1087-1088, 1989.

Orita, M. ; Iwahana, H. ; Kanazawa, H. ; Hayachi, K. ; Sekiya, T. : **Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 2766-70, 1989.

Ottini, L. ; Esposito, D.L. ; Richetta, A. ; Carlesimo, M. ; Palmirotta, R. ; Veri, M.C. ; Battista, P. ; Frati, L. ; Caramia, F.G. ; Calvieri, S. : **Alteration of microsatellites in neurofibromas of von Recklinghausen's Disease**. *Cancer Res.* 55 : 5677-80, 1995.

Passarge, E. : **Atlas de poche de génétique**. Medecine-Sciences Flammarion, 1995.

Purandare, S.M. ; Lanyon, W.G. ; Connor, J.M. : **Characterization of inherited and sporadic mutations in neurofibromatosis type 1.** Hum. Mol. Genet. 3 : 1109-1115, 1994.

Purandare, S.M.; Lanyon, W.G.; Arngrimsson, R.; Connor, J.M.: **Characterisation of a novel splice donor mutation affecting position +1 in intron 18 of the NF-1 gene.** Hum. Molec. Genet. 4: 767-768, 1995.

Purandare, S.M. ; Cawthon, R. ; Nelson, L.M. ; Sawada, S. ; Watkins, W.S. ; Ward, K. ; Jorde, L.B. ; Viskochil, D.H. : **Genotyping of PCR based polymorphisms and linkage disequilibrium analysis at the NF1 locus.** Am. J. Hum. Genet. 59 : 169-176, 1996.

Riccardi, V.M.: **Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and Pathogenesis.** 2<sup>nd</sup> Ed. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press , 1992.

Riccardi, V.M.; Mulvihill, J.J.: **Neurofibromatosis (Von Recklinghausen Disease): Genetics, Cell Biology, and Biochemistry.** Advances in Neurology. New York: Raven Press 29, 1981.

Robinson, P.N.; Buske, A.; Neumann, R.; Tinschert, S.; Nurnberg, P.: **Recurrent 2-bp deletion in exon 10c of the NF1 gene in two cases of Von Recklinghausen neurofibromatosis.** Hum. Mutat. 7: 85-88, 1996.

Rodenshiser, D.I.; Cloutier-Mackie, M.B. : **Evidence of DNA methylation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene region of 17q11.2.** Hum. Mol. Genet. 2 : 439-444, 1993.

Rodenshiser, D.I. ; Hovland, D. ; Andrews, J. D. ; Jung, J.H. ; Gillett, J.M.R. ; Ainsworth, P.J. ; Clouter-Mackie, M. ; Singh, S.M. : **A five base pair deletion in a direct-repeat region within exon 39 of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.** Hum. Mol. Genet. 5 : 503-507, 1996.

Rodenshiser, D.I. ; Andrews, J.D. ; Mancini, D.N. ; Jung, J.H. ; Singh, S.M. : **Homonucleotide tracts, short repeats and CpG/CpNpG motifs are frequent sites for heterogenous mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) tumour-suppressor gene.** Mutat. Res. 373 : 185-195, 1997.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. : **Molecular Cloning - A Laboratory manual** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. : **DNA sequencing with chain terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 5462-5467, 1977.

Sarkar, G.; Yoon, H.S.; Sommer, S.S. : **Screening for mutation by RNA single strand conformation polymorphism : comparaison with DNA-SSCP.** Nucleic Acids Res. 20: 871-878, 1992.

Sawada, S.; Monda, M.; Nimura, M.: **Molecular genetic analysis of the Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method.** J. Dermatol. 21: 295-300, 1994.

Seizinger, B.R.; Farmer, G.E.; Haines, J.L.; Ozelius, L.J.; Anderson, K.; Korf, B.R.; Parry, D.M.; Pericak-Vance, M.A.; Mulvihill, J.J.; Menon, A.; Hobbs, W.J.; Martuza, R.L.; Gusella, J.F.: **Flanking markers for the gene causing Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1).** Am. J. Hum. Genet. 44: 30-32, 1989.

Shannon, K.M.; O'Connell, P.; Martin, G.A.; Paderanga, D.; Olson, K.; Dinndorf, P.; McCormick, F.: **Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders.** New Eng. J. Med. 330: 597-601, 1994.

Shen, M.H. ; Harper, P.S. ; Upadhyaya, M. : **Neurofibromatosis type 1(NF1) : the search for mutations by PCR-heteroduplex analysis on Hydrolink gels.** Hum. Mol. Genet. 2 : 1861-1864, 1993a.

Shen, M.H.; Upadhyaya, M. : **A de novo nonsense mutation in exon 28 of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.** Hum. Genet. 92 : 410-412, 1993b.

Shen, M.H. ; Upadhyaya, M. : **Two single base polymorphisms in introns 41 and 16 of the NF1 gene.** Am. J. Med. Genet. 60 : 147-149, 1995.

Shen, M. H. ; Harper, P. S. ; Upadhyaya, M **Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1).** J. Med. Genet. 33 :2-17, 1996.

Singer, M. ; Berg, P. : **Genes & Genomes.** Edition Vigot ,1992.

Silva, A.J. ; Frankland, P.W. ; Marowitz, Z. ; Friedman, E. ; Lazlo, G. ; Cioffi, D. ; Jacks, T. ; Bourtschuladze, R. : **A mouse model for learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type 1.** Nature Genetics. 15 : 281-284, 1997.

Tassabehji, M.; Strachan, T.; Sharland, M.; Colley, A.; Donnai, D.; Harris, R.; Thakker, N.: **Tandem duplication within a neurofibromatosis type 1 (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome.** Am. J. Hum. Genet. 53: 90-95, 1993.

Upadhyaya, M.; Cheryson, A.; Broadhead, W.; Fryer, A.; Shaw, D.J.; Huson, S.; Wallace, M.R.; Andersen, L.B.; Marchuk, D.A.; Viskochil, D.; Black, D.; O'Connell, P.; Collins, F.s.; Harper, P.S.: **A 90 kb DNA deletion associated with neurofibromatosis type 1.** J. Med. Genet. 27: 738-741, 1990.

Upadhyaya, M.; Shen, M.; Cheryson, A.; Farnham, J.; Maynard, J.; Huson, S.M.; Harper, P.S.: **Analysis of mutations at the neurofibromatosis 1 (NF1) locus.** Hum. Molec. Genet. 1: 735-740, 1992.

Upadhyaya, M.; Maynard, J.; Osborn, M.; Huson, S.M.; Ponder, M.; Ponder, B.A.J.; Harper, P.S.: **Characterisation for germline mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.** J. Med. Genet. 32: 706-710, 1995.

Upadhyaya, M. ; Roberts, S.H. ; Maynard, J. ; Sourour, E. ; Thompson, P.W. ; Vaughan, M. ; Wilkie, A.O.M. ; Hughes, H.E. : **A cytogenetic deletion, del(17) (q11.22q21.1), in a patient with sporadic neurofibromatosis type 1 (NF1) associated with dysmorphism and developmental delay.** J. Med. Genet. 33 :148-152,1996a

Upadhyaya, M.; Osborn, M.J.; Maynard, J.; Harper, P.S. : **Characterization of six mutation in exon 37 of neurofibromatosis type 1 gene.** Am. J. Med. Genet. 67 : 421-423, 1996b.

Upadhyaya, M. ; Osborn, M.J. ; Maynard, J. ; Kim, M.R. ; Tamanoi, F. ; Cooper, D.N. : **Mutational and fonctional analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene.** Hum. Genet. 99 : 88-92,1997.

Valero, M.C.; Velasco, E.D.; Moreno, F. : **Linkage disequilibrium between four intragenic polymorphic microsatellites of the NF1 gene and its implications for genetic counselling.** J. Med. Genet. 33 : 590-593, 1996.

Viskochil, D.; Buchberg, A.M.; Xu, G.; Cawthon, R.M.; Stevens, J.; Wolff, R.K.; Culver, M.; Carey, J.C.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; White, R.; O'Connell, P.: **Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus.** Cell 62: 187-192, 1990.

Wallace, M.; Fountain, J.; Ledbetter, D.H.; Leach, R.; Fournier, R.E.K.; O'Connell, P.; White, R.; Seizinger, B.; Menon, A.; Gusella, J.F.; Collins, F.S.: **A Not I linking clone detects the 17q11.2 breakpoints in two patients with Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1).** (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 51: 1101, 1989.

Wallace, M.R.; Andersen, L.B.; Marchuk, D.A.; Mitchell, A.L.; Letcher, R.; Odeh, H.; Saulino, A.M.; Brereton, A.; Collins, F.S.: **Candidate genes in the Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) region.** Am. J. Hum. Genet. 47 (suppl.): A240, 1990a.

Wallace, M.R.; Marchuk, D.A.; Andersen, L.B.; Letcher, R.; Odeh, H.M.; Saulino, A.M.; Fountain, J.W.; Brereton, A.; Nicholson, J.; Mitchell, A.L.; Brownstein, B.H.; Collins, F.S.: **Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients.** Science 249: 181-186, 1990b.

Wallace, M.R.; Andersen, L.B.; Saulino, A.M.; Gregory, P.E.; Glover, T.W.; Collins, F.S.: **A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1.** Nature 353: 864-866, 1991.

Watson, J.D.; Gilman, M.; Witkowski, J.; Zoller, M. : **DNA Recombinant.** Scientific american books ,1993.



Weiming, X.; Yu, Q.; Lizhi, L.; Ponder, M.; Wallace, M.; Gangfeng, X.; Ponder, B.: **Molecular analysis of neurofibromatosis type 1 mutations.** Hum. Mutat. 1: 474-477, 1992.

Weinberg, R.A.; Jacks, T.; Shaneshih, T.; Schmitt, E.M.; Bronson, R.T.: **Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in NF1.** Am. J. Genet. 54:123- 143, 1994.

Wu, B.L.; Austin, M.A.; Schneider, G.H.; Boles, R.G.; Korf, B.R.: **Deletion of the entire NF1 gene detected by FISH: four deletion patients associated with severe manifestations.** Am. J. Med. Genet. 59: 528-535, 1995.

Wu, B.L.; Legius, E. ; Robberrecht, W. ; Dumoulin, M. ; Cassiman, J.J. ; Fryns,J.P. : **Neurofibromatosis type 1 gene mutation in a patient with features of Leopard syndrom.** Hum. Mutat. 8 :51-56,1996.

Wu, B.L.; Schneider, G.H.; Korf, B.R. : **Deletion of the entire NF1 gene causing distinct manifestations in a family.** Am. J. Med. Genet. 69 : 98-101, 1997.

Xu, G.; O'Connell, P.; Viskochil, D.; Cawthon, R.; Robertson, M.; Culver, M.; Dunn, D.; Stevens, J.; Gesteland, R.; White, R.; Weiss, R.: **The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP.** Cell 62: 599-608, 1990.

Xu, G.; O'Connell, P.; Stevens, J.; White, R.: **Characterization of human adenylate kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene.** Genomics 13: 537-542, 1992.

Youil, R.; Kemper, B.W.; Cotton, R.G.H. : **Screening for mutation by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 87-91, 1995.

Zhong, J. ; Spiegel, R. ; Boltshauser, E. ; Schmid, W. : **Two novels mutations : 5108delAG and 5816insG in the NF1 gene.** Hum. Mol. Genet. 2 :1491-1492, 1993.

# ANNEXE I : L'ADNc du gène NF1

La séquence nucléotidique et les exons de l'ADNc du gène NF1 (Cawthon et al., 1990b; Wallace et al., 1990b; Xu et al., 1990; Marchuk et al., 1991) :

```

1  ATG|Exon 1→GCCGCGC ACAGGCCGGT GGAATGGGTC CAGGCCGTGG TCAGCCGCTT
51  CGACGAGCAG|Exon 2→CTTCCAATAA AACAGGACA GCAGAACACA CATACCAAAG
    ←Exon 1
101 TCAGTACTGA GCACAACAAG GAATGTCTAA TCAATATTTC CAAATACAAG
151 TTTTCTTTGG TTATAAGCGG CCTCACTACT ATTTTAAAGA ATGTTAACAA
201  TATG|Exon 3→AGAATA TTTGGAGAAG CTGCTGAAAA AAATTTATAT CTCTCTCAGT
    ←Exon 2
251 TGATTATATT GGATACACTG GAAAAATGTC TTGCTGGG|Exon 4a→CA ACCAAAGGAC
    ←Exon 3
301 ACAATGAGAT TAGATGAAAC GATGCTGGTC AAACAGTTGC TGCCAGAAAT
351 CTGCCATTTT CTTCACACCT GTCGTGAAGG AAACCAGCAT GCAGCTGAAC
401 TTCGGAATTC TGCCTCTGGG GTTTTATTTT CTCTCAGCTG CAACAAC TTC
451 AATGCAGTCT TTAGTCGCAT TTCTACCAG|Exon 4b→G TTACAGGAAT TAACTGTTTG
    ←Exon 4a
501 TTCAGAAGAC AATGTTGATG TTCATGATAT AGAATTGTTA CAGTATATCA
551 ATGTGGATTG TGCAAAATTA AAACGACTCC TGAAGG|Exon 4c→AAAC AGCATTTAAA
    ←Exon 4b
601 TTAAAGCCC TAAAGAAGGT TGC GCAGTTATAA ATAGCCTGGA
651  AAAG|Exon 5→GCATTT TGGAAGTGGG TAGAAAATTA TCCAGATGAA TTTACAAAAC
    ←Exon 4c
701 TGTACCAGAT CCCACAGACT GATATGGCTG|Exon 6→AAATGTCAGA AAAGCTATTT
    ←Exon 5
751 GACTTGGTGG ATGGTTTTGC TGAAAGCACC AAACGTAAAG CAGCAGTTTG
801 GCCACTACAA ATCATTCTCC TTATCTTGTG TCCAGAAATA ATCCAGGATA

```

851 TATCCAAAGA CGTGGTTGAT GAAAACAACA TGAATAAGAA GTTATTTCTG  
 901 GACAGTCTAC GAAAAGCTCT TGCTGGCCAT GGAGGAAGTA GGCAGCTGAC  
 951 AGAAAGTGCT GCAATTGCCT GTGTCAAAC TGTAAAGCA AGTACTTACA  
 1001 TCAATTGGGA AGATAACTCT GTCATTTTCC TACTTGTTCA GTCCATGGTG  
 1051 GTTGATCTTA AGAACCTGCT TTTAATCCA AGTAAGCCAT TCTCAAGAGG  
 1101 CAGTCAGCCT GCAGATGTGG ATCTAATGAT TGACTGCCTT GTTTCTTGCT  
 1151 TTCGTATAAG CCCTCACAAC AACCAACACT TTAAGATCTG CCTGGCTCAG  
 1201 AATTCACCTT CTACATTTCA CTATGTGCTG GTAAATTCAC TCCATCGAAT  
 1251 CATCACCAAT TCCGCATTGG ATTGGTGGCC TAAGATTGAT GCTGTGTATT  
 1301 GTCACTCGGT TGAAGTTCGA AATATGTTTG GTGAAACACT TCATAAAGCA  
 1351 GTGCAAGGTT GTGGAGCACA CCCAGCAATA CGAATGGCAC CGAGTCTTAC  
 1401 ATTTAAAGAA AAAGTAACAA GCCTTAAATT TAAAGAAAAA CCTACAGACC  
 1451 TGGAGACAAG AAGCTATAAG TATCTTCTCT TGTCCATGGT GAAACTAATT  
 1501 CATGCAGATC CAAAGCTCTT GCTTTGTAAT CCAAGAAAAC AGGGGCCCCGA  
 1551 AACCCAAGGC AGTACAGCAG AATTAATTAC AGGGCTCGTC CAACTGGTCC  
 1601 CTCAGTCACA CATGCCAGAG ATTGCTCAGG AAGCAATGGA GGCTCTGCTG  
 1651 GTTCTTCATC AGTTAGATAG CATTGATTG TGGAATCCTG ATGCTCCTGT  
 1701 AGAAACATTT TGGGAGATTA GCTCACAAAT GCTTTTTTAC ATCTGCAAGA  
 1751 AATTAAGTAG TCATCAAATG CTTAGTAGCA CAGAAATTCT CAAGTGGTTG  
 1801 CGGGAAATAT TGATCTGCAG GAATAAATTT CTTCTTAAAA ATAAGCAGGC  
 1851 AGATAGAAGT TCCTGTCACT TTCTCCTTTT TTACGGGGTA GGATGTGATA  
 1901 TTCCTTCTAG TGGAATACC AGTCAAATGT CCATGGATCA TGAAGAATTA  
 1951 CTACGTACTC CTGGAGCCTC TCTCCGGAAG GGAAAAGGGA ACTCCTCTAT

2001 <sup>Exon 13→</sup>GGATAGTGCA GCAGGATGCA GCGGAACCCC CCCAATTTCG CGACAAGCCC  
 ←Exon 12b|  
 2051 AGACCAAACCT AGAAGTGGCC CTGTACATGT TTCTGTGGAA CCCTGACACT  
 2101 GAAGCTGTTC TGGTTGCCAT GTCCTGTTTC CGCCACCTCT GTGAGGAAGC  
 2151 AGATATCCGG TGTGGGGTGG ATGAAGTGTC AGTGCATAAC CTCTTGCCCA  
 2201 ACTATAACAC ATTCATGGAG TTTGCCTCTG TCAGCAATAT GATGTCAACA  
 2251 <sup>Exon 14→</sup>GGAAGAGCAG CACTTCAGAA AAGAGTGATG GCACTGCTGA GGC GCATTGA  
 ←Exon 13|  
 2301 GCATCCCCT GCAGGAAACA <sup>Exon 15→</sup>CTGAGGCTTG GGAAGATACA CATGCAAAAT  
 ←Exon 14|  
 2351 GGGAACAAGC AACAAAGCTA ATCCTTAACT ATCCAAAAGC CAAAATGGAA  
 2401 <sup>Exon 16→</sup>GATGGCCAGG CTGCTGAAAG CCTTCACAAG ACCATTGTGA AGAGGCGAAT  
 ←Exon 15|  
 2451 GTCCCATGTG AGTGGAGGA GGATCCATAGA TTTGTCTGAC ACAGACTCCC  
 2501 TACAGGAATG GATCAACATG ACTGGCTTCC TTTGTGCCCT TGGAGGAGTG  
 2551 TGCCTCCAGC AGAGAAGCAA TTCTGGCCTG GCAACCTATA GCCCACCCTAT  
 2601 GGGTCCAGTC AGTGAACGTA AGGGTTCTAT GATTTCAGTG ATGTCTTCAG  
 2651 AGGGAAACGC AGATACACCT GTCAGCAAAT TTATGGATCG GCTGTTGTCC  
 2701 TTAATGGTGT GTAACCATGA GAAAGTGGGA CTTCAAATAC GGACCAATGT  
 2751 TAAGGATCTG GTGGGTCTAG AATTGAGTCC TGCTCTGTAT CCAATGCTAT  
 2801 TTAACAAATT GAAGAATACC ATCAGCAAGT TTTTGGACTC CCAAGGACAG|  
 ←Exon 16|  
 2851 <sup>Exon 17→</sup>GTTTATTGA CTGATACCAA TACTCAATTT GTAGAACAAA CCATAGCTAT  
 2901 AATGAAGAAC TTGCTAGATA ATCATACTGA AGGCAGCTCT GAACATCTAG  
 2951 GGCAAGCTAG CATTGAAACA ATGATGTAA ATCTGGTCAG|  
 ←Exon 17|  
 3001 GTGCTTGGGA ATATGGTCCA TGCAATTCAA ATAAAAACGA AACTGTGTCA  
 3051 ATTAGTTGAA GTAATGATGG CAAGGAGAGA TGACCTCTCA TTTTGCCAAG  
 3101 <sup>Exon 19a→</sup>AGATGAAATT TAGGAATAAG ATGGTAGAAT ACCTGACAGA CTGGGTTATG  
 ←Exon 18|

3151 GGAACATCAA ACCAAGCAGC AGATGATGAT GTAAAATGTC TTACAAGAGA Exon 19b→  
←Exon 19a  
 3201 TTTGGACCAG GCAAGCATGG AAGCAGTAGT TTCACTTCTA GCTGGTCTCC  
 3251 CTCTGCAGCC TGAAGAAGGA GATGGTGTGG AATTGATGGA AGCCAAATCA  
 3301 CAGTTATTTC TTAA Exon 20→ CACATTATTT ATGAACCTTT TGAATGACTG  
←Exon 19b  
 3351 CAGTGAAGTT GAAGATGAAA GTGCGCAAAC AGGTGGCAGG AAACGTGGCA  
 3401 TGTCTCGGAG GCTGGCATCA CTGAGGCACT GTACGGTCCT TGCAATGTCA  
 3451 AACTTACTCA ATGCCAACGT AGACAGTGGT CTCATGCACT CCATAGGCTT Exon 21→  
←Exon 20  
 3501 AGGTTACCAC AAGGATCTCC AGACAAGAGC TACATTTATG GAAGTTCTGA  
 3551 CAAAATCCT TCAACAAGGC ACAGAATTTG ACACACTTGC AGAAACAGTA  
 3601 TTGGCTGATC GGTTTGAGAG ATTGGTGGAA CTGGTCACAA TGATGGGTG  
 3651 ATCAAGGAGAA CTCCTATAG CGATGGCTCT GGCCAATGTG GTTCCTTGTT  
 3701 CTCAGTGGGA Exon 22→ TGAACTAGCT CGAGTTCTGG TTA CTCTGTT TGATTCTCGG  
←Exon 21  
 3751 CATTTACTCT ACCAACTGCT CTGGAACATG TTTTCTAAAG AAGTAGAATT  
 3801 GGCAGACTCC ATGCAGACTC TCTTCCGAGG CAACAGCTTG GCCAGTAAAA  
 3851 TAATGACATT CTGTTTCAAG Exon 23-1→ GTATATGGTG CTACCTATCT AAAAAA ACTC  
←Exon 22  
 3901 CTGGATCCTT TATTACGAAT TGTGATCACA TCCTCTGATT GGCAACATGT  
←Exon 23-1  
 3951 TAGCTTTGAA GTGGATCCTA CCAG Exon 23-2→ GTTAGA ACCATCAGAG AGCCTTGAGG  
←Exon 23-1  
 4001 AAAACCAGCG GAACCTCCTT CAGATGACTG AAAAGTTCTT CCATGCCATC  
 4051 ATCAGTTCCT CCTCAGAATT CCCCCTCAA CTCGAAGTG TGTGCCACTG  
 4101 TTTATACCAG Exon 24→ GTGGTTAGCC AGCGTTTCCC TCAGAACAGC ATCGGTGCAG  
←Exon 23-2  
 4151 TAGGAAGTGC CATGTTCTC AGATTTATCA ATCCTGCCAC ACCAACCCCG  
 4201 TACGAAGGCA GTATTTTAGA TAAAAAGCCA CCACCTAGAA TCGAAAGGGG  
 4251 CTTGAAGTTA ATGTCAAAGA Exon 25→ TACTTCAGAG TATTGCCAAT CATGTTCTCT  
←Exon 24

4301 TCACAAAAGA AGAACATATG CGGCCTTTCA ATGATTTTGT GAAAAGCAAC  
 4351 TTTGATGCAG CACGCAG<sup>Exon 26→</sup>GTT <sup>←Exon 25</sup>TTTCCTTGAT ATAGCATCTG ATTGTCCTAC  
 4401AAGTGATGCA GTAAATCATA GTCTTTCCTT CATAAGTGAC GGCAATGTGC  
 4451 TTGCTTTACA TCGTCTACTC TGGAACAATC AGGAGAAAAT TGGGCAGTAT  
 4501 CTTTCCAGCA ACAG<sup>Exon 27a→</sup>GGATCA <sup>←Exon 26</sup>TAAAGCTGTT GGAAGACGAC CTTTGTATAA  
 4551 GATGGCAACA CTTCTTGCAT ACCTGGGTCC TCCAGAGCAC AAACCTGTGG  
 4601 CAGATACACA CTGGTCCAGC CTTAACCTTA CCAGTTCAAA GTTTGAGGAA  
 4651 TTTATGACTA <sup>Exon 27b→</sup>G<sup>←Exon 27a</sup>GCATCAGGT ACATGAAAAA GAAGAATTCA AGGCTTTGAA  
 4701 AACGTTAAGT ATTTTCTACC AAGCTGGGAC TTCCAAAGCT GGAATCCTA  
 4751 TTTTTTATTA TGTGACACGG <sup>Exon 28→</sup>AG<sup>←Exon 27b</sup>TTTCAAAA CTGGTCAAAT CAATGGTGAT  
 4801 TTGCTGATAT ACCATGTCTT ACTGACTTTA AAGCCATATT ATGCAAAGCC  
 4851 ATATGAAATT GTAGTGGACC TTACCCATAC CGGGCCTAGC AATCGCTTTA  
 4901 AAACAGACTT TCTCTCTAAG TGGTTTGTTG TTTTTCCTGG CTTTGCTTAC  
 4951 GACAACGTCT CCGCAGTCTA TATCTATAAC TGTAACCTCT GGGTCAGGGA  
 5001 GTACACCAAG TATCATGAGC GGCTGCTGAC TGGCCTCAAA GGTAGCAAAA  
 5051 GGCTTGTTTT CATAGACTGT CCTGGGAAAC TGGCTGAGCA CATAGAGCAC  
 5101 TGCCTGAAAC CCTGTTCTGC TGCCACCTTG GCTTTAGAAG AGGACCTGAA  
 5151 GGTATTCCAC AATGCTCTCA AGCTAGCTCA CAAAGACACC AAAGTTTCTA  
 5201 TTAAAG<sup>Exon 29→</sup>TTGG <sup>←Exon 28</sup>TTCTACTGCT GTCCAAGTAA CTTCAGCAGA GCGAACAAAA  
 5251 GTCCTAGGGC AATCAGTCTT TCTAAATGAC ATTTATTATG CTTTCGGAAAT  
 5301 TGAAGAAATC TGCCTAGTAG ATGAGAACCA GTTCACCTTA ACCATTGCAA  
 5351 ACCAGGGCAC GCCGCTCACC TTCATGCACC AGGAGTGTGA AGCCATTGTC  
 5401 CAGTCTATCA TTCATATCCG GACCCGCTGG GAACTGTCAC AGCCCGACTC

5451 TATCCCCCAA CACACCAAGA TTCGGCCAAA AGATGTCCCT GGGACACTGC  
 5501 TCAATATCGC ATTACTTAAT TTAGGCAGTT CTGACCCGAG TTTACG|<sup>Exon 30→</sup>  
 5551 GCTGCCTATA ATCTTCTGTG TGCCTTAACT TGTACCTTTA ATTTAAAAAT  
 5601 CGAGGGCCAG TTAGTAGAGA CATCAGGTTT ATGTATCCCT GCCAACAACA  
 5651 CCCTCTTTAT TGTCTCTATT AGTAAGACAC TGGCAGCCAA TGAGCCACAC  
 5701 CTCACGTTAG AATTTTGGGA AGAGTGTATT TCTGGATTTA GCAAATCTAG|<sup>Exon 31→</sup>  
 5751 TATTGAATTG AAACACCTTT GTTTGGAATA CATGACTCCA TGGCTGTCAA  
 5801 ATCTAGTTCG TTTTGGCAAG CATAATGATG ATGCCAAACG ACAAAGAGTT  
 5851 ACTGCTATTC TTGACAAGCT GATAACAATG ACCATCAATG AAAAACAGAT  
 5901 GTACCCATCT ATTCAAGCAA AAATATGGGG AAGCCTTGGG CAG|<sup>Exon 32→</sup>  
 5951 ATCTGCTTGA TGTTGTAATA GACAGTTTCA TCAAAACCAG TGCAACAGGT  
 6001 GGCTTGGGAT CAATAAAAGC TGAGGTGATG GCAGATACTG CTGTAGCTTT  
 6051 GGCTTCTGGA AATGTGAAAT TGGTTTCAAG CAAG|<sup>Exon 33→</sup>  
 6101 GCAAATAAT TGACAAGACA TGCTTATCTC CAACTCCTAC TTTAGAACAA  
 6151 CATCTTATGT GGGATGATAT TGCTATTTTA GCACGCTACA TGCTGATGCT  
 6201 GTCCTTCAAC AATTCCCTTG ATGTGGCAGC TCATCTTCCC TACCTCTTCC  
 6251 ACGTTGTTAC TTTCTTAGTA GCCACAGGTC CGCTCTCCCT TAGAGCTTCC  
 6301 ACACATGGAC TGGTCATTAA TATCATTCAC TCTCTGTGTA CTTGTTTACA  
 6351 GCTTCATTTT AGT|<sup>Exon 34→</sup>  
 6401 AGTTCTCATT ACCCAAATTT TACTTGCTGT TTGGCATTAG CAAAGTCAAG  
 6451 TCAGCTGCTG TCATTGCCTT CCGTTCCAGT TACCGGGACA GGTCATTCTC  
 6501 TCCTGGCTCC TATGAGAGAG AGACTTTTGT GTGGACATCT ACTCGCTGGG  
 6551 TCACAGAAGC TTTGTTGGAG ATCATGGAG|<sup>Exon 35→</sup>  
 6601 CATGCATGAG AGATATTCCA  
 6651

6601 ACGTGCAAGT GGCTGGACCA GTGGACAGAA CTAGCTCAA GATTTCATT  
 6651 CCAATATAAT CCATCCCTGC AACCAAGAGC TCTTGTTGTC TTTGGGTGTA  
 6701 TTAGCAAACG AGTGTCTCAT GGGCAGATAA AGCAGATAAT CCGTATTCTT  
 6751 AGCAAGGCAC TTGAGAGTTG CTAAAAGGA CCTGACACTT ACAACAGTCA  
 6801 AGTTCTGATA GAAGCTACAG TAATAGCACT AACCAAATTA CAGCCACTTC  
 6851 TTAATAAGGA CTCGCCTCTG CACAAAGCCC TCTTTTGGGT AGCTGTGGCT  
 6901 GTGCTGCAGC TTGATGAGGT CAACTTGTAT TCAGCAGGTA CCGCACTTCT  
 6951 TGAACAAAAC CTGCATACTT TAGATAGTCT CCGTATATTC AATGACAAGA  
 7001 GTCCAGAGGA AGTATTTATG GCAATCCGGA ATCCTCTGGA GTGGCACTGC  
 7051 AAGCAAATGG ATCATTTTGT TGGACTCAAT TTCAACTCTA ACTTTAACTT  
 7101 TGCATTGGTT GGACACCTTT TAAAAGGGTA CAGGCATCCT TCACCTGCTA  
 7151 TTGTTGCAAG AACAGTCAGA ATTTTACATA CACTACTAAC TCTGGTTAAC  
 7201 AAACACAGAA ATTGTGACAA ATTTGAAGTG AATACACAGA GCGTGGCCTA  
 7251 CTTAGCAGCT TTAATTACAG TGTCTGAAGA AGTTCGAAGT CGCTGCAGCC  
 7301 TAAACATAG AAAGTCACTT CTTCTTACTG ATATTTC AAT GGAAAATGTT  
 7351 CCTATGGATA CATATCCCAT TCATCATGGT GACCCTTCCT ATAGGACACT  
 7401 AAAGGAGACT CAGCCATGGT CCTCTCCCAA AGGTTCTGAA GGATACCTTG  
 7451 CAGCCACCTA TCCAAGTGC GGCCAGACCA GTCCCCGAGC CAGGAAATCC  
 7501 ATGAGCCTGG ACATGGGGCA ACCTTCTCAG GCCAACACTA AGAAGTTGCT  
 7551 TGAACAAGG AAAAGTTTTG ATCACTTGAT ATCAGACACA AAGGCTCCTA  
 7601 AAAGGCAAGA AATGGAATCA GGGATCACAA CACCCCCCAA AATGAGGAGA  
 7651 GTAGCAGAAA CTGATTATGA AATGGA AACT CAGAGGATTT CCTCATCACA  
 7701 ACAGCACCCA CATTTACGTA AAGTTTCAGT GTCTGAATCA AATGTTCTCT



7751 TGGATGAAGA AGTACTTACT GATCCGAAGA TCCAGGCGCT GCTTCTTACT  
 7801 GTTCTAGCTA CACTGGTAAA ATATACCACA GATGAGTTTG ATCAACGAAT  
 7851 TCTTTATGAA TACTTAGCAG AGGCCAGTGT TGTGTTTCCC AAAGTCTTTC  
 7901 CTGTTTGCA TAATTTGTTG GACTCTAAGA TCAACACCCT GTTATCATTG  
 7951 TGCCAAGATC CAAATTTGTT AAATCCAATC CATGGAATTG TGCAGAGTGT  
 8001 GGTGTACCAT GAAGAATCCC CACCACAATA CCAAACATCT TACCTGCAAA  
 8051 GTTTTGGTTT TAATGGCTTG TGGCGGTTTG CAGGACCGTT TTCAAAGCAA  
 8101 ACACAAATTC CAGACTATGC TGAGCTTATT GTTAAGTTTC TTGATGCCTT  
 8151 GATTGACACG TACCTGCCTG GAATTGATGA AGAAACCAGT GAAGAATCCC  
 8201 TCCTGACTCC CACATCTCCT TACCCTCCTG CACTGCAGAG CCAGCTTAGT  
 8251 ATCACTGCCA ACCTTAACCT TTCTAATTCC ATGACCTCAC TTGCAACTTC  
 8301 CCAGCATTCC CCAAGGAATCG ACAAGGAGAA CGTTGAACTC TCCCCTACCA  
 8351 CTGGCCACTG TAACAGTGGA CGAACTCGCC ACGGATCCGC AAGCCAAGTG  
 8401 CAGAAGCAAA GAAGCGCTGG CAGTTTCAAA CGTAATAGCA TTAAGAAGAT  
 8451 CGTGTGAGC TTGCTTGCTT TCTTTTTTAA AATCAACTTA ACATGGGCTC  
 8501 TTCACTAGTG ACCCCTTCCC TGTCCCTGCC CTTTCCCCC ATGTTGTAAT  
 8551 GCTGCACTTC CTGTTTTATA ATGAACCCAT CCGGTTTGCC ATGTTGCCAG  
 8601 ATGATCAACT CTTCGAAGCC TTGCCTAAAT TTAATGCTGC CTTTTCTTTA  
 8651 ACTTTTTTTC TTCTACTTTT GGCGTGTATC TGGTATATGT AAGTGTTTCA  
 8701 AACAACTGCA AAGAAAGTGG GAGGTCAGGA AACTTTTAAC TGAGAAAT

## ANNEXE II: La neurofibromine

La séquence des acides aminés constituant la neurofibromine ( Cawthon et al., 1990b; Wallace et al., 1990b; Xu et al., 1990 et Marchuk et al., 1991) :

```

1  MAAHRPVEWV  QAVVSRFDEQ  LPIKTGQQNT  HTKVSTEHNK  ECLINISKYK
51 FSLVISGLTT  ILKNVNNMRI  FGEEAEKNLY  LSQLIILDTL  EKCLAGQPKD
101 TMRLDETM LV  KQLLPEIC HF  LHTCREGNQH  AAELRNSASG  VLFSLSCNNF
151 NAVFSRISTR  LQELTVCS ED  NVDVHDIELL  QYINVDCAKL  KRLLKETAFK
201 FKALKKVAQL  AVINSLEKAF  WNWVENYPDE  FTKLYQIPQT  DMAECAEKL F
251 DLVDGFAEST  KRKAAVWPLQ  IILLILCPEI  IQDISKDVVD  ENNMNKKLFL
301 DSLRKALAGH  GGSRQLTESA  AIACVKLCKA  STYNWEDNS  VIFLLVQSMV
351 VDLKNLLFNP  SKPFSRGSQP  ADVDL MIDCL  VSCFRISPHN  NQHF KICLAQ
401 NSPSTFHYVL  VNSLHRIITN  SALDWWPKID  AVYCHSVELR  NMFGETLHKA
451 VQGCGAHPAI  RMAPSLTFKE  KVTSLKFKEK  PTDLETRSYK  YLLLSMVKLI
501 HADPKLLLCN  PRKQGPETQG  STAELITGLV  QLV PQSHMPE  IAQEAMEALL
551 VLHQ LDSIDL  WNP DAPVETF  WEISSQMLFY  ICKKLTSHQM  LSSTEILKWL
601 REILICRNKF  LLKNKQADRS  SCHFL LFYGV  GCDIPSSGNT  SQMSMDHEEL
651 LRTPGASLRK  GKGNSSMDSA  AGCSGTPPIC  RQAQTKLEVA  LYMFLWNPDT
701 EAVLVAMSCF  RHLCEEADIR  CGVDEVSVHN  LLPNYNTFME  FASVSNMMST
751 GRAALQKRVM  ALLRRIEHPT  AGNTEAWEDT  HAKWEQATKL  ILNYPKAME
801 DGQAAESLHK  TIVKRRMSHV  SGGGSIDLS D  TDSLQEWINM  TGFLCALGGV

```

851 CLQQRNSNGL ATYSPPMGPV SERKGSMISV MSSEGNADTP VSKFMDRLLS  
 901 LMVCNHEKVG LQIRTNVKDL VGLELSPALY PMLFNKLKNT ISKFFDSQGG  
 951 VLLTDTNTQF VEQTIAIMKN LLDNHTEGSS EHLGQASIET MMLNLVRYVR  
 1001 VLGNMVHAIQ IKTKLCQLVE VMMARRDDL SFCQEMKFRNK MVEYLTDWVM  
 1051 GTSNQAADDD VKCLTRDL DQASMEAVVSL AGLPLQPEEG DGVELMEAKS  
 1101 QLFLKYFTLF MNLLNDCSEV EDESAQTGGR KRGMSRRLAS LRHCTVLAMS  
 1151 NLLNANVDSG LMHSIGLGYH KDLQTRATFM EVLTKILQQG TEFDTLAETV  
 1201 LADRFERLVE LVTMMGDQGE LPIAMALANV VPCSQWDELA RVLVTLFDSR  
 1251 HLLYQLLWNM FSKEVELADS MQTLFRGNSL ASKIMTFCFK VYGATYLQKL  
 1301 LDPLLRIVIT SSDWQHVSFE VDPTRLEPSE SLEENQRNLL QMTEKFFHAI  
 1351 ISSSSEFPQ LRSVCHCLYQ ATCHSLLNKA TVKEKKENKK SVVSQRFPQN  
 1401 SIGAVGSAMF LRFINPATPT PYEGSILDKK PPPRIERGLK LMSKILQZIA  
 1451 NHVLFTKEEH MRPFNDFVKS NFDAARRFFL DIASDCPTSD AVNHSLSFIS  
 1501 DGNVLALHRL LWNNQEKIGQ YLSSNRDHKA VGRRPFDKMA TLLAYLGPPE  
 1551 HKPVADTHWS SLNLTSSKFE EFMTRHQVHE KEEFKALKTL SIFYQAGTSK  
 1601 AGNPIFYIVA RRFKTGQING DLLIYHVLLT LKPYYAKPYE IVVDLTHTGP  
 1651 SNRFKTDFLS KWFVVFPGFA YDNVSAVYIY NCNSWVREYT KYHERLLTGL  
 1701 KGSKRLVFID CPGKLAEHIE HCLKPWSAAT LALEEDLKVF HNALKLAHKD  
 1751 TKVSIKVGST AVQVTSART KVLGQSVFLN DIYYASEIEE ICLVDENQFT  
 1801 LTIANQGTPL TFMHQECEAI VQSIHIRTR WELSQPDSIP QHTKIRPKDV  
 1851 PGTLNIAL LNLGSSDPSLR SAAYNLLCAL TCTFNLKIEG QLLETSGLCI  
 1901 PANNTLFIVS ISKTLANEP HLTLEFLEEC ISGFSKSSIE LKHLCLEYMT

1951 PWLSNLVRFC KHNDDAKRQR VTAILDKLIT MTINEKQMYP SIQAKIWGSL  
2001 GQITDLLDVV LDSFIKTSAT GGLGSIKAEV MADTAVALAS GNVKLVSSKV  
2051 IGRMCKIIDK TCLSPTPTLE QHLMWDDIAI LARYMLMLSF NNSLDVAAHL  
2101 PYLFHVVTFL VATGPLSLRA STHGLVINII HSLCTCSQLH FSEETKQVLR  
2151 LSLTEFSLPK FYLLFGISKV KSAAVIAFRS SYRDRSFSPG SYERETFVWT  
2201 STRWVTEALL EIMEACMRDI PTCKWLDQWT ELAQRFAFQY NPSLQPRALV  
2251 VFGCISKRVS HGQIKQIIRI LSKALESCLK GPDTYNSQVL IEATVIALTK  
2301 LQPLLNKDSP LHKALFWVAV AVLQLDEVNL YSAGTALLEQ NLHTLDSLRI  
2351 FNDKSPEEVF MAIRNPLEWH CKQMDHFVGL NFNSNFNFAL VGHLLKGYRH  
2401 PSPAIVARTV RILHTLLTLV NKHRNCDKFE VNTQSVAYLA ALLTVSEEV  
2451 SRCSLKHRKS LLLTDISMEN VPMDTYPIHH GDPSYRTLKE TQPWSSPKGS  
2501 EGYLAATYPT VGQTSPRARK SMSLDMGQPS QANTKKLLGT RKSFDHLISD  
2551 TKAPKRQEME SGITTPPKMR RVAETDYEME TQRISSSQQH PHLRKVSVSE  
2601 SNVLLDEEVL TDPKIQALL TVLATLVKYT TDEFDQRILY EYLAEASVVF  
2651 PKVFPVVHNL LDSKINTLLS LCQDPNLLNP IHGIVQSVVY HEESPPQYQT  
2701 SYLQSFGFNG LWRFAGPFSK QTQIPDYAEL IVKFLDALID TYLPGIDEET  
2751 SEESLLTPTS PYPPALQSQL SITANLNLSN SMTSLATSQH SPGIDKENVE  
2801 LSPTTGHCNS GRTRHGSASQ VQKQRSAGSF KRNSIKKIV